

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: **AMO GONZÁLEZ, JAVIER DEL**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D325 DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

DEPARTAMENTO DE: **BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 30/06/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **MIGUEL ANGEL JIMÉNEZ CLAVERO // M^a. ISABEL GEGÚNDEZ CÁMARA**.

Sobre el siguiente tema: *EL VIRUS WEST NILE: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE SU INTERACCIÓN CON UN HOSPEDADOR NATURAL, EL GORRIÓN COMUN, Y DESARROLLO DE UN METODO CUANTITATIVO PARA SU DETECCIÓN DIFERENCIAL*

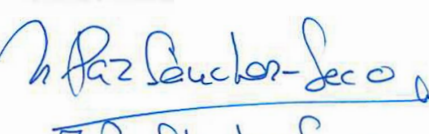
Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL² de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): **SOBRESALIENTE**

Alcalá de Henares, 30 de Junio de 2017

EL PRESIDENTE


Fdo.: Lourdes Lledo

EL SECRETARIO


Fdo.: Al. Paz Sánchez-Seco

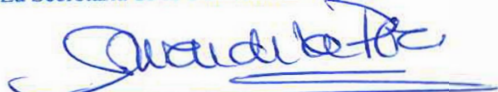
EL VOCAL


Fdo.: José Martínez de la Puente

Con fecha 24 de junio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



FIRMA DEL ALUMNO,


Fdo.: Javier del Amo González

² La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por AMO GONZÁLEZ, JAVIER DEL, el día 30 de junio de 2017, titulada *EL VIRUS WEST NILE: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE SU INTERACCIÓN CON UN HOSPEDADOR NATURAL, EL GORRIÓN COMUN, Y DESARROLLO DE UN METODO CUANTITATIVO PARA SU DETECCIÓN DIFERENCIAL*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado resuelve otorgar a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 27 julio de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Firmado digitalmente por VELASCO
PEREZ JUAN RAMON - DNI
03087239H
Fecha: 2017.07.28 11:11:39 -06'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: AMO GONZÁLEZ, JAVIER DEL

Secretario del Tribunal: MARÍA PAZ SÁNCHEZ-SECO.

Directores de Tesis: MIGUEL ANGEL JIMÉNEZ CLAVERO // M^a. ISABEL GEGÚNDEZ CÁMARA

**Javier
del Amo**



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (D325)

El virus West Nile: estudio experimental de su interacción con un hospedador natural, el gorrión común, y desarrollo de un método cuantitativo para su detección diferencial

Tesis Doctoral presentada por Javier del Amo González

2017

2017

El virus West Nile: estudio experimental de su interacción con un hospedador natural, el gorrión común, y desarrollo de un método cuantitativo para su detección diferencial



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (D325)

**El virus West Nile: estudio
experimental de su interacción con un
hospedador natural, el gorrión común,
y desarrollo de un método cuantitativo
para su detección diferencial**

Tesis Doctoral presentada por Javier del Amo González

**Director: Dr. Miguel Ángel Jiménez Clavero
Codirectora: Dra. María Isabel Gegúndez Cámara**

Alcalá de Henares, 2017

**A mis padres, por su
apoyo incondicional.**

**A Maya, Luca, y
Rocío.**

Si se siembra la semilla con fe y se cuida con perseverancia, sólo es cuestión de tiempo recoger sus frutos.

Thomas Carlyle

La constancia no está en empezar sino en perseverar.

Leonardo da Vinci

Agradecimientos

Ahora que ha llegado el momento de defender esta Tesis doctoral no son pocas las personas a las que tengo que agradecer el poder hacerlo. Mi andadura en esto de la ciencia empezó ya hace tiempo, aquí en la Universidad de Alcalá. Después de un camino largo e infructuoso me planteé seriamente abandonar mi sueño de doctorarme, por suerte, después de mi paso por la Universidad, empecé a trabajar en el CISA. Allí se me brindó la posibilidad de retomar mi aspiración de convertirme en Doctor y aquí estamos ahora...

Antes que nadie quiero agradecer a mis padres todo su apoyo, amor y dedicación. Nunca me ha faltado su ayuda y su confianza. Papá, mamá nunca podré agradecerlos lo suficiente todo lo que habéis hecho por mí. Esta Tesis es en parte un reconocimiento a vosotros porque sin vosotros habría sido imposible haber llegado hasta aquí.

A mi mujer, Maya. Has sufrido a mi lado más que nadie, incondicionalmente. Desde el principio has sido mi consejera, para lo bueno y para lo malo; el brazo en el que apoyarme tantas veces cuando me faltaban las fuerzas. Sabes que eres un ejemplo para mí. Por eso y por mucho más esta Tesis también te pertenece.

A Miguel Ángel, mi director y mentor. Me diste la oportunidad de realizar esta Tesis cuando te lo propuse, sin ese primer paso este momento no sería posible. Ha sido un enorme placer trabajar contigo, he aprendido muchas cosas a tu lado, tanto en el ámbito profesional como personal. He disfrutado mucho el proceso de escritura y publicación de los artículos, intercambiando opiniones e impresiones, sacándole todo el jugo posible a los artículos. Tu extraordinaria positividad ha sido la mejor de tus armas durante este largo proceso. Por todo ello, ¡gracias!

A Maribel, mi co-directora, gracias por tu ayuda en la elaboración de esta Tesis. Tu visión ha sido muy útil para conformar una redacción más sólida. En fin, por hacerme la vida más fácil. Sin tu visión y tus correcciones esta Tesis no sería la misma.

A Carmina, gracias por tu acogida y supervisión en el proyecto de la RT-PCR, quizás el más arduo y complicado de los que afronté en el CISA.

A mis compañeros de laboratorio del CISA, Leny, Paco, Cris, Elisa y María. He aprendido mucho de todos vosotros. Leny, tuviste mucha paciencia conmigo las primeras semanas, me enseñaste las técnicas y protocolos fundamentales para desarrollar mi investigación. Tu trabajo son los cimientos del mío. Paco, siempre has estado ahí para echarme una mano y aportarme tu experiencia. Cris, has sido un ejemplo de tesón y trabajo. Elisa, llegaste la última pero has sido vital en este proceso y un espejo donde mirarme. María, gracias por todos tus consejos y trucos. ¡Gracias a todos!

A Lourdes, sabes que contigo la relación ha sido muy especial. Siempre me has aconsejado bien. Valoro mucho tu opinión y no sólo sobre el Lidl, ¡ya me entiendes!

A mis compañeras Nuria, Noelia, Yoli y Noemí. Gracias por vuestra compañía y vuestras confidencias. He disfrutado mucho de nuestras charlas en la cafetería. Sin vosotras mi estancia en el CISA habría sido mucho más monótona.

A Lorenzo, sin duda nada de esto habría sido posible sin la mano que me tendiste y la puerta que me abriste cuando más lo necesitaba.

A Jordi Figuerola y Ramón Soriguer. Vuestra colaboración ha sido fundamental para llevar a cabo mis experimentos. La visita a la Estación Biológica de Doñana fue fascinante. ¡Sois unos anfitriones fantásticos!

Al txoco. ¿Cómo olvidarme de mi querido txoco, del Barco de colegas? Pomatta, Isra, Lobo, Javitron, Lukende, Garri, Diego, Domi, Peter y Boris. Mis mejores amigos. Compañeros de toda una vida y protagonistas de ella. Sabéis como nadie la pasión y energías que he puesto en todo esto. Lo vamos a celebrar a lo grande, no os quepa la menor duda. Os quiero chicos.

Índice

Estructura y contenido de la Tesis	1
Introducción	3
Visión general y relevancia del virus West Nile en el marco de la salud pública.....	4
Técnicas de detección y diagnóstico de la infección por el virus West Nile	7
Objetivos	11
Capítulo I	14
<i>Dinámicas de transmisión del WNV: el papel de los mosquitos y de las aves, el índice de competencia (Ci) y las diferencias epidemiológicas entre el Nuevo Mundo y el Viejo Mundo.</i>	14
Estructura molecular del WNV, infección celular y ciclo de replicación en el hospedador	15
Patogenia	18
Taxonomía, filogenia y distribución geográfica del WNV	21
Ciclo de transmisión del WNV	25
Papel de los mosquitos en la transmisión del WNV	26
Papel de las aves en la transmisión del WNV	29
Los passeriformes y el gorrión común en relación con el WNV.....	34
El gorrión común (<i>Passer domesticus</i>)	35
Competencia e índice de competencia del hospedador	39
a) Vector competente para la transmisión del WNV	39
b) Hospedador competente para la transmisión del WNV	39
Índice de competencia del hospedador (Ci)	40
c) Competencia de comunidad	41
Dinámicas de transmisión de WNV en distintos territorios: América, Europa y la cuenca mediterránea	42

Viejo Mundo vs. Nuevo Mundo: Breve resumen de las causas de la diferente eco-epidemiología.....	46
Conclusión.....	49
Referencias.....	50
Capítulo II.....	62
<i>A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus.</i>	<i>62</i>
Capítulo III.....	71
<i>Experimental infection of house sparrows (Passer domesticus) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins.....</i>	<i>71</i>
Capítulo IV.....	82
<i>Experimental infection of house sparrows (Passer domesticus) with two different West Nile virus strains: NY99 (lineage 1) and Austria/2008 (lineage 2).</i>	<i>82</i>
Conclusiones	90

Estructura y contenido de la Tesis

Esta Tesis doctoral está estructurada siguiendo la normativa de la Universidad de Alcalá para Tesis doctorales por capítulos. Comienza con una Introducción donde se explican los conceptos necesarios para facilitar la comprensión de los capítulos incluidos y de los objetivos perseguidos. La introducción termina con la descripción de los objetivos de cada publicación y con la bibliografía usada para su redacción.

A continuación se presentan los cuatro capítulos de los que consta esta Tesis. El primero de ellos (I) es una revisión de la materia sobre la que versa el contenido fundamental de la Tesis. Los siguientes tres capítulos (II, III y IV) son los tres trabajos publicados por el doctorando como primer autor, respetándose el orden cronológico de cada publicación (Tabla 1). En cuanto a su contenido, éste ha sido añadido y ordenado tal y como aparece en las publicaciones originales. De este modo, estas tres publicaciones están estructuradas como sigue:

- Resumen (Abstract)
- Introducción (Introduction)
- Materiales y métodos (Materials and methods)
- Resultados (Results)
- Discusión (Discussion)
- Agradecimientos (Acknowledgements)
- Bibliografía (References)

Después de los capítulos se incluyen las principales conclusiones que se derivan de los trabajos publicados.

Tabla 1. Resumen de los capítulos incluidos

Capítulo	Título del artículo	Año de publicación	Revista
I	Dinámicas de transmisión del WNV: El papel de mosquitos y aves, el índice de competencia y las diferencias epidemiológicas entre el Nuevo Mundo y el Viejo Mundo		
II	A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and Usutu virus	2013	Journal of Virological Methods
III	Experimental infection of house sparrows (<i>Passer domesticus</i>) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins	2014	Veterinary Research
IV	Experimental infection of house sparrows (<i>Passer domesticus</i>) with two different West Nile virus strains: NY99 (lineage 1) and Austria/2008 (lineage 2)	2014	Veterinary Microbiology

Introducción

Visión general y relevancia del virus West Nile en el marco de la salud pública

El virus West Nile (WNV), es un arbovirus zoonótico perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Es un patógeno emergente en varias partes de Europa y Estados Unidos que constituye un riesgo para la salud pública y la sanidad animal en ambas regiones (Kolman JM et al., 1973; Kramer LD et al., 2008). El WNV recibe su nombre de la zona en la que fue aislado por primera vez, en el distrito de West Nile (Uganda) en 1937, a partir de la sangre de una mujer que presentaba un cuadro febril (Smithburn KC et al., 1940).

Este virus se mantiene en la naturaleza en un ciclo mosquito-ave-mosquito, en el cual el principal vector de transmisión son los mosquitos ornitofílicos del género *Culex* (Gubler DJ et al., 2007; Hayes CG et al., 2001; Petersen LR et al., 2001) y un amplio rango de aves silvestres actúan como reservorio en el mantenimiento y transmisión del virus (Work TH et al., 1955). Algunas aves passeriformes son reservorios especialmente importantes por su alta capacidad para replicar el virus (Komar N et al., 2003b).

El WNV tiene una distribución mundial, detectándose en todos los continentes (excepto en la Antártida) y prácticamente en todas las regiones tropicales y de climas templados del mundo (Hayes CG et al., 1988). La clasificación del WNV en linajes genéticos está basada en la secuencia nucleotídica de su genoma, aunque el número de linajes propuestos varía dependiendo del autor y de la bibliografía que se consulte (Bakonyi T et al., 2005 y 2006; Vázquez A et al., 2010; Pachler K et al., 2014; Rizzoli A et al., 2015).

El WNV afecta con especial virulencia a humanos y equinos, por ello son de especial interés para la salud pública y la sanidad animal (Petersen LR y Roehrig JT, 2001; Campbell GL et al., 2002). Ambos son considerados hospedadores accidentales o en fondo de saco, es decir, son infectados por el virus pero un mosquito que se alimenta de ellos no es capaz de adquirir el virus en cantidad suficiente como para poder transmitirlo de nuevo a otro hospedador. A pesar de todo, el WNV es causante

de una enfermedad neuroinvasiva (encefalitis) en humanos y caballos que tiene serias repercusiones sanitarias. Esta enfermedad es conocida como encefalitis por virus West Nile y puede ocasionar la muerte en algunos casos (alrededor de 1 de cada 24 casos clínicos en humanos). Todo ello unido al hecho de que este patógeno puede propagarse con evidente rapidez hace que sea una de las enfermedades incluidas tanto en el Reglamento Sanitario Internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS, www.who.int) como en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, www.oie.int).

La enfermedad provocada por el WNV cobró especial interés en el ámbito de la salud pública y la prevención de enfermedades emergentes a partir de los brotes ocurridos en Rumanía (1996), Israel (1998-99), Rusia (1999) y, sobre todo, Estados Unidos (1999) (Tsai TF et al., 1998; Hayes CG et al., 2001). En las últimas décadas este interés ha resurgido con mayor importancia si cabe. Prueba de ello son los brotes ocurridos recientemente en Europa que ponen de manifiesto la capacidad de este virus para colonizar y extenderse rápidamente por nuevas áreas geográficas, detectándose en numerosos países y regiones de la cuenca del Mediterráneo, Europa del Este, Balcanes y Centro Europa (Zeller HG et al., 2004; Sambri V et al., 2013).

La eco-epidemiología del WNV en Europa y Norteamérica presenta diferencias notables. En Norteamérica se ha caracterizado por una alta morbilidad y mortalidad de las aves silvestres, mientras que los brotes en aves en Europa son esporádicos y poco frecuentes. En los últimos años esta situación ha ido cambiando, y mientras que la actividad del WNV en EEUU se ha estabilizado, en el mismo período en Europa asistimos a un aumento de brotes en caballos, aves y humanos (Rizzoli A et al., 2015). Estas diferencias requieren una explicación satisfactoria y hacen necesario ampliar el conocimiento sobre la eco-epidemiología de este virus. De hecho, algunos autores han señalado las lagunas existentes en la ecología, transmisión, patogenia y/o detección del virus y la necesidad de seguir realizando nuevos estudios (Rizzoli A et al., 2015).

Para seguir avanzando en el conocimiento de la biología del WNV los modelos animales constituyen una herramienta fundamental: los ratones se han usado muy frecuentemente como modelo para estudiar la enfermedad neuroinvasiva provocada

por el WNV en mamíferos (Beasley DW et al., 2005; Sotelo E et al., 2009). Estos estudios abordan, entre otras cuestiones, la mortalidad provocada por distintas cepas del virus, permitiendo así establecer la dosis letal 50 (LD₅₀), la respuesta inmune innata y adaptativa desencadenada por el virus o la descripción de la enfermedad en el hospedador a nivel histopatológico y clínico (Lim SM et al., 2011; Samuel MA et al., 2006).

Los mamíferos son hospedadores que no participan en el ciclo de amplificación y transmisión natural del virus, por eso su utilidad como modelos experimentales es limitada si se trata de ahondar en aspectos específicos de la biología del WNV que afectan a la dispersión geográfica del virus. En este caso, los modelos animales basados en sus hospedadores naturales, las aves silvestres, son los más adecuados. Los estudios en aves han ayudado a conocer la capacidad de replicación del virus en distintas especies de pájaros y su susceptibilidad a la infección, así como la virulencia de las cepas circulantes, entre otras cuestiones (Bowen RA y Nemeth NM, 2007; Perez-Ramirez E et al., 2014). A la capacidad de un ave para replicar el virus a niveles infecciosos para los mosquitos que se alimentan de su sangre se le denomina “competencia como reservorio”. Esta cualidad del hospedador se mide por el Ci (del inglés *Competence index*, Komar N et al., 2003b). La competencia como reservorio, junto con la ecología propia de cada especie de ave, tienen relación directa con la capacidad del virus para introducirse en nuevos territorios. En este aspecto, las aves migratorias, la selección del hospedador en la dieta de los mosquitos (“*host selection*” o “*feeding pattern*”) y las aves clave en la transmisión del virus se han descrito como aspectos relevantes en la eco-epidemiología del WNV y por tanto en su dispersión (Hamer GL et al., 2009; Kilpatrick AM et al., 2006a).

Algunas especies de aves paseriformes, como el gorrión común (*Passer domesticus*) o el mirlo americano (*Turdus migratorius*) son reservorios altamente competentes por su capacidad para replicar el virus, alcanzando viremias muy altas y sostenidas en el tiempo (Komar N et al., 2003b; Kilpatrick AM et al., 2006a). De estas dos especies, el gorrión común presenta algunas ventajas como modelo experimental. Siendo un ave muy abundante y ampliamente distribuida, no sólo por toda Europa y Norteamérica, sino a nivel mundial, permite abordar estudios comparativos entre

cepas de WNV de muy distinto origen geográfico. Hay que mencionar también que la proximidad del gorrión común al ser humano y su adaptación a entornos urbanos le hacen muy útil en estudios de análisis de riesgo para el hombre y en modelos predictivos de la enfermedad. La infección experimental de gorriones comunes con distintos aislados víricos responsables de los brotes recientemente ocurridos en Europa puede ayudar a ampliar el conocimiento de la eco-epidemiología del virus, pues las diferencias eco-epidemiológicas observadas en las distintas áreas geográficas afectadas pueden correlacionarse directamente con las cepas circulantes en cada lugar, independientemente del efecto del hospedador, pues el gorrión común está presente en amplias zonas. Todo esto unido a las observaciones y estudios de campo ayudará a comprender mejor los diferentes factores implicados en la transmisión del WNV.

Técnicas de detección y diagnóstico de la infección por el virus West Nile

En lo que se refiere a la detección y diagnóstico del WNV, cabe mencionar que existen tres grupos de técnicas principalmente (De Filette M et al., 2012):

Técnicas indirectas: Estas técnicas se fundamentan en la detección de anticuerpos generados frente al virus como consecuencia de la infección. Clásicamente, las técnicas de cribado serológico se basaban en la inhibición de la hemaglutinación (HAI) o la fijación del complemento (CFT), pero éstas están hoy día en desuso, habiendo sido desplazadas por la técnica del enzoinmunoensayo en fase sólida (ELISA) más apta para el cribado serológico. El diagnóstico se basa en la determinación de inmunoglobulinas de la clase M o la seroconversión de IgG frente al virus. La presencia de IgM específica en suero o en líquido cefalorraquídeo se considera prueba de confirmación diagnóstica de la infección primaria reciente por WNV en caballos con signos clínicos compatibles con la enfermedad, si bien en humanos requiere de un paso ulterior de confirmación, debido a la posible confusión con otras infecciones clínicas causadas por flavivirus. Los sueros de individuos infectados por flavivirus muestran reactividad cruzada con anticuerpos frente a

flavivirus heterólogos, lo que da lugar a falsos positivos. Esto ocurre con mayor frecuencia en las técnicas de cribado, menos específicas que las técnicas de confirmación. La técnica más específica es el test de la virus-neutralización (VNT), en sus dos formatos principales: la prueba de la reducción del número de placas (de sus siglas en inglés PRNT) y la micro-VNT, o virus-neutralización en formato de microcultivo (placa de 96 pocillos). Siendo más específica que las técnicas de cribado, la VNT no está totalmente exenta del problema de la reactividad cruzada entre flavivirus, aunque en este caso está restringida a los flavivirus del mismo serocomplejo. Por ejemplo, los virus pertenecientes al serocomplejo de la encefalitis japonesa, que incluyen, además de al virus de la encefalitis japonesa, (JEV), a los virus West Nile (WNV); Usutu (USUV); encefalitis de Saint Louis (SLEV), y encefalitis del valle de Murray (MVEV), entre otros, reaccionan de forma cruzada entre sí en esta prueba. Sin embargo, es posible diferenciarlos realizando titulaciones de anticuerpos neutralizantes (AcNt) por VNT en paralelo frente a los distintos antígenos víricos y comparando las titulaciones obtenidas frente a cada uno de ellos. La especificidad se asigna al obtenerse un título al menos cuatro veces superior frente a un determinado flavivirus que frente al resto de flavivirus examinados. La VNT permite igualmente confirmar un diagnóstico serológico por seroconversión: es decir, cuando se observa un aumento de al menos cuatro veces el título de AcNt entre un suero obtenido en la fase aguda y otro en la fase convaleciente de la infección.

Técnicas de detección directa por métodos moleculares: Se refieren principalmente a las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR), en sus diversos formatos, convencionales y en tiempo real, y a otras técnicas de amplificación específica de ácidos nucleicos, menos extendidas pero igualmente útiles, como la LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) y la NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), todas ellas dirigidas a detectar ARN del WNV en las muestras. Las técnicas moleculares se han convertido en el método estándar para la detección y cuantificación de ARN viral. La RT-PCR en tiempo real en particular añade la dimensión cuantitativa y la facilidad de lectura automatizada, lo que, junto a los sistemas de extracción automática de ácidos nucleicos ha permitido incrementar la escala de análisis muy significativamente, siendo

hoy día la técnica de elección para el diagnóstico molecular de numerosos microorganismos patógenos. Otra ventaja de esta técnica es que, al ofrecer resultados cuantitativos, la estandarización del ensayo y el control de calidad del mismo resultan más sencillos. De este modo, esta técnica se ha establecido como una de las más importantes tanto en laboratorios de diagnóstico clínico como en los de investigación básica.

Técnicas de cultivo y aislamiento de virus: El aislamiento del virus es la culminación de un buen diagnóstico, confirmando las técnicas anteriormente citadas, obteniéndose la cepa aislada del brote para estudios de caracterización genética, antigénica y fenotípica. Las líneas celulares más usadas para el cultivo del WNV en el laboratorio son las Vero, VeroE6, BSR y BHK, todas ellas de animales vertebrados, o las células de mosquito C6/36. Se pueden utilizar otros sustratos, como por ejemplo huevos embrionados, o incluso cerebro de ratones lactantes, y combinaciones de éstos con células de diferentes tipos en pases sucesivos. Tras la inoculación en el cultivo celular el virus se propaga en el interior de las células, en las cuales, y como consecuencia de la infección, se desarrolla un efecto citopático a los 4-6 días dependiendo de la cepa de WNV y de la línea celular usada. Una vez se termina el ciclo de infección y se recoge el virus, es necesario proceder a la identificación del virus aislado, generalmente por RT-PCR.

Para poner en el contexto apropiado la necesidad de mejorar continuamente los distintos métodos para la detección del WNV, cabe mencionar que en la última década en Europa ha habido un aumento de la actividad del WNV, con más brotes y mayor extensión, sumándose a los virus del linaje 1, ya presentes en el continente desde 1996, la introducción de nuevas variantes del virus pertenecientes al linaje 2 de WNV, que es actualmente el más extendido en el sur y en el este del continente. Además, el virus Usutu, un flavivirus encuadrado dentro del serocomplejo de la encefalitis japonesa, también ha ocasionado brotes recientes en numerosos países de Europa incluidos Italia y España (Ashraf U et al., 2015). Debido a la reciente actividad detectada de los linajes 1 y 2 de WNV y al hecho de que el virus Usutu puede producir reacción cruzada frente al WNV en las técnicas de diagnóstico serológicas, se hacen más necesarios y urgentes que nunca métodos que puedan distinguir de manera

eficiente y específica entre aislados pertenecientes al linaje 1 y 2 de WNV y el virus Usutu.

Objetivos

Objetivos del capítulo I: *Dinámicas de transmisión del WNV: El papel de mosquitos y aves, el índice de competencia (Ci) y las diferencias epidemiológicas entre el Nuevo Mundo y el Viejo Mundo.*

1.- Compilar y resumir la información necesaria para ayudar a la comprensión y contextualización de los restantes capítulos de la Tesis.

Objetivos del capítulo II: *A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus.*

1.- Mejorar la técnica de diagnóstico desarrollada en el CISA, otorgándole carácter cuantitativo mediante el calibrado con rectas patrón de secuencias específicas de ARN de concentración conocida.

Objetivos del capítulo III: *Experimental infection of house sparrows (Passer domesticus) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins.*

1.- Reproducir el modelo de infección experimental por WNV desarrollado en Estados Unidos, basado en el uso del gorrión común, con especímenes del continente europeo capturados en España.

2.- Estudiar comparativamente el curso de la infección provocada por diferentes cepas virales de origen europeo y norteamericano pertenecientes al linaje 1.

3.- Evaluar la capacidad de transmisión (índice de competencia) del gorrión común para las cepas virales estudiadas.

Objetivos del capítulo IV: *Experimental infection of house sparrows (Passer domesticus) with two different West Nile virus strains: NY99 (lineage 1) and Austria/2008 (lineage 2).*

Objetivos

1.- Estudiar comparativamente el curso de la infección provocada por diferentes cepas virales pertenecientes al linaje 1 y linaje 2 de origen norteamericano y europeo, respectivamente.

2.- Evaluar la capacidad de transmisión (índice de competencia) del gorrión común para las cepas virales estudiadas.

Capítulo I

Dinámicas de transmisión del WNV: el papel de los mosquitos y de las aves, el índice de competencia (Ci) y las diferencias epidemiológicas entre el Nuevo Mundo y el Viejo Mundo.

En este primer capítulo se abordan brevemente algunos aspectos generales del virus, tales como su estructura molecular, su clasificación y su ciclo de transmisión. Se continúa con la influencia de los mosquitos y de las aves en las dinámicas de transmisión del WNV, para, seguidamente, exponer el significado e importancia del índice de competencia (Ci) asociado a cada aislado viral para establecer su capacidad de transmisión. Por último, se incide en las diferencias epidemiológicas del WNV existentes entre Europa y Norteamérica.

Estructura molecular del WNV, infección celular y ciclo de replicación en el hospedador

El WNV es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* que se engloba dentro del serocomplejo de la encefalitis japonesa (JEV en sus siglas en inglés). Es un virus esférico de aproximadamente 50 nm de diámetro. Posee una envoltura lipídica que rodea una nucleocápside de simetría icosaédrica que encierra un genoma de ARN de cadena simple y polaridad positiva de 11 kilobases aproximadamente (Guirakhoo F et al., 1992; Mukhopadhyay S et al., 2003) (ver Figura 1). El genoma codifica una única poliproteína que es escindida por proteasas celulares y víricas en 10 proteínas víricas, tres estructurales (E, M y C) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Stadler K et al., 1997; Rosendaal J et al., 2006) (ver Figura 2).

En la envoltura del virión se encuentran dos proteínas transmembrana estructurales, la proteína E (o “de la envoltura”) y la proteína M (o “de la matriz”). La cápside está formada por la proteína C (o “del core”). Los monómeros de la proteína C se asocian entre si dando lugar a una cápside de geometría icosaédrica característica del WNV (ver Figura 1). La proteína E es una glicoproteína muy expuesta en la superficie del virión que tiene importantes funciones en la biología del virus como son la interacción con receptores, la fusión de membranas y el ensamblaje de los viriones. Así mismo, la proteína E posee los principales sitios antigénicos del virus.

Figura 1. Esquema del virión del WNV (autoría propia)

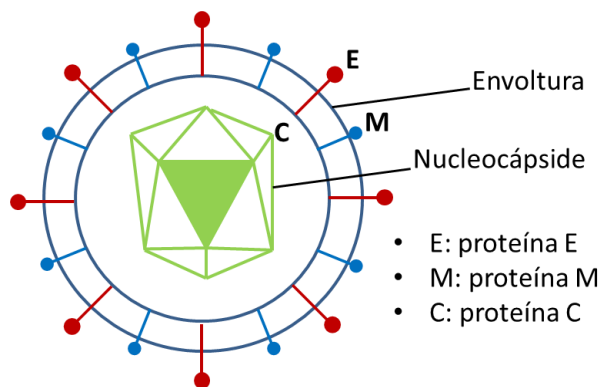
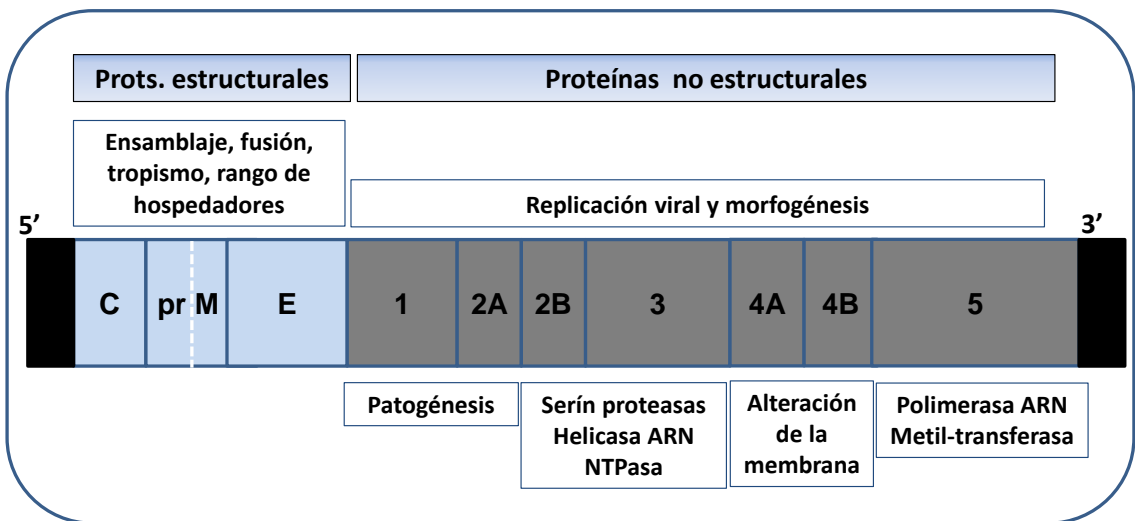


Figura 2. Estructura del genoma del WNV (11 Kb) detallando los componentes proteicos codificados y sus funciones (adaptado de De Filette M et al., 2012).



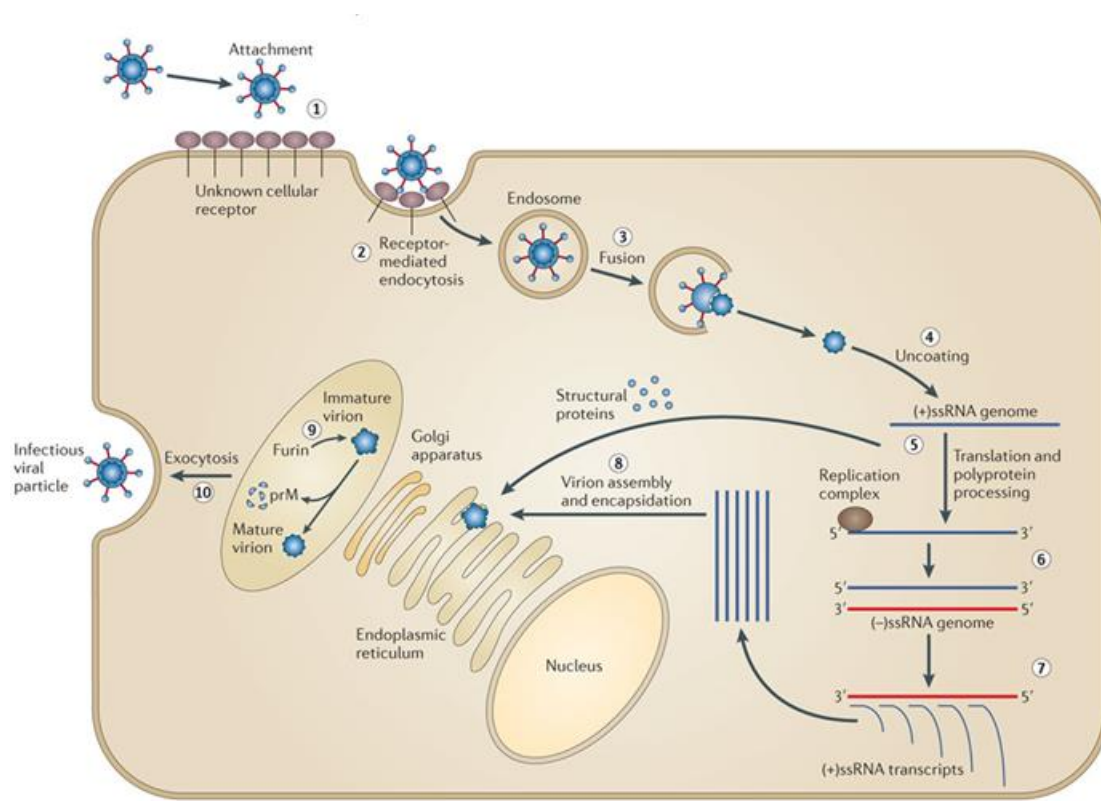
La replicación del WNV en la célula del hospedador empieza con la unión del virus a la superficie celular. Aunque aún no se conoce el receptor celular del WNV, se han propuesto algunos posibles receptores como el DC-SIGN o determinadas integrinas (Chu JJ et al., 2004). El WNV penetra en la célula vía endocitosis mediada por receptor. En el endosoma la proteína E sufre cambios estructurales provocando que el péptido de fusión quede expuesto y que se inserte en la membrana del endosoma. A continuación se fusionan las membranas del virión y del endosoma, lo que provoca que la nucleocápside sea liberada al citosol. Entonces, el ARN vírico es liberado también y puede comenzar la síntesis de la poliproteína (ver Figura 3).

El genoma del WNV codifica una única poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos. Como se señaló anteriormente, esta proteína es procesada tanto por proteasas celulares como por la proteasa vírica NS2B-NS3, lo cual da lugar a tres proteínas estructurales y siete no estructurales (ver Figura 2).

La replicación de los flavivirus necesita la acción de la polimerasa vírica NS5 que es ARN-dependiente. Esta enzima produce una cadena de ARN de orientación negativa (anti-sentido) que sirve de molde para la producción de multitud de copias del genoma infectivo de ARN positivo. Los flavivirus inducen cambios muy grandes en la morfología de las membranas intracelulares, algo muy frecuente en los virus ARN-positivos. En estos cambios juega un papel importante la proteína NS4A (Rosendaal J et al., 2006). El ARN y las proteínas víricas se acumulan en estructuras formadas por la membrana del hospedador que se denominan complejos de replicación.

A continuación comienza el proceso de ensamblaje, en el cual el ARN se asocia con la proteína C en el citoplasma formando la nucleocápside, ésta se asocia a su vez con las proteínas E y prM en el lumen del retículo endoplásmico. El ensamblaje del virus se realiza con membranas derivadas del propio retículo endoplásmico. En esta fase los viriones inmaduros tienen asociadas las proteínas E y prM formando heterotrímeros. Los viriones en su estado inmaduro son entonces dirigidos a través de los canales de secreción donde completan su proceso de maduración en el compartimento trans-Golgi. Un paso clave en la maduración de los viriones son los cambios que se producen en estas proteínas favorecidos por el pH acidificado del aparato de Golgi. La proteína E sufre un cambio conformacional o reordenamiento y la proteína prM es procesada por furinas dando lugar a la proteína M. Es entonces cuando ambas proteínas se disocian y las proteínas E pueden formar homodímeros (Stadler K et al., 1997). Finalmente, los viriones maduros abandonan la célula fusionándose la membrana de las vesículas que lo transportan con la membrana celular. Cabe mencionar que la replicación y posterior salida de viriones maduros de las células de vertebrados suele provocar en ésta un efecto citopático.

Figura 3. Fases del ciclo de replicación intracelular del virus West Nile (Suthar MS et al., 2013)



1. Adhesión a la célula; 2. Endocitosis mediada por receptores; 3. Fusión de la envoltura lipídica con el endosoma; 4. Apertura de la nucleocápside y liberación del ARN; 5. Traducción y procesamiento de la poliproteína; 6. Replicación del ARN; 7. Generación de múltiples copias de ARN de polaridad positiva; 8. Ensamblaje y encapsidación de los viriones; 9. Maduración de los viriones; 10. Exocitosis.

Patogenia

En lo que se refiere a la patogenia y tropismo del WNV en el hospedador, la mayoría de los estudios han sido realizados en modelos de ratón y ave. Tras la picadura del mosquito infectado al hospedador, el WNV inoculado entra en contacto con queratinocitos (Lim PY et al., 2011) y con las células de Langerhans en la región intradérmica. En los queratinocitos, el receptor de reconocimiento de patógenos TLR-7 es activado liberándose citoquinas como la IL-1b que propicia la migración de las

células de Langerhans hacia los nódulos linfáticos (Byrne SN et al., 2001; Welte T et al., 2009). Tras una breve viremia el WNV se disemina de forma sistémica por el organismo del hospedador alcanzando diversos órganos, como bazo, riñón o hígado, pudiendo infectar un amplio rango de tipos celulares. Finalmente, el WNV puede llegar a atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el sistema nervioso central (SNC) (Kramer LD et al., 2001).

Se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales el WNV es capaz de penetrar en el SNC. Los estudios de estos mecanismos de neuroinvasión están realizados en modelos *in vitro* e *in vivo*, y entre estos últimos, la mayoría en modelos murinos y aviares. Por razones obvias, muy pocos de ellos se han llevado a cabo en hospedadores accidentales como el hombre o el caballo. Ello, unido al hecho de que existen importantes diferencias metodológicas entre los distintos estudios publicados (Suen WW et al., 2014), hace que los resultados observados en estos modelos en cuanto a la patogenia del WNV sean difíciles de extrapolar directamente al ser humano, y deban de tomarse siempre con cautela. Brevemente, siguiendo el texto de Suen y colaboradores (Suen WW et al., 2014), los mecanismos propuestos de neuroinvasión por los cuales el WNV sería capaz de acceder al SNC son la vía hemática y la vía transneuronal, también denominada migración retrógrada.

En la vía hemática el virus debe atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para poder acceder finalmente al SNC. Para atravesar la BHE el virus tendría dos vías de entrada, la vía transendotelial y la vía paracelular. En la vía transendotelial, el WNV se introduciría a través de las células endoteliales que conforman la BHE, posiblemente a través de los sistemas de transporte especializados de la célula. En la vía paracelular el virus dispone de dos mecanismos distintos de entrada:

- a) La difusión pasiva: la entrada de viriones ocurre a través de las uniones estrechas de las células endoteliales de la BHE y donde se requiere que las uniones íntimas entre estas células estén debilitadas, es decir, que la integridad de la BHE esté alterada.

- b) Modelo “Caballo de Troya”: la entrada al SNC se produce mediante el tráfico de leucocitos infectados por WNV al interior de la BHE. Al igual que la anterior requeriría de una BHE permeabilizada.

En la ruta transneuronal o migración retrógrada pueden diferenciarse dos tipos de acceso al SNC:

- a) Desde los nervios periféricos al SNC.
- b) Desde el nervio olfativo hasta el bulbo olfativo.

Algunos estudios han descrito varios determinantes genéticos de patogenicidad en el WNV, entre ellos algunos implicados en su capacidad de neuroinvasión (resumidos en Suen WW et al., 2014). La mayoría de estudios han usado modelos *in vitro* con el objetivo de investigar el papel de estos determinantes de neuroinvasión en la interacción del virus con la superficie celular del hospedador y su unión a ella, la evasión inmune o la ruptura de las uniones intercelulares. Se hace necesario que estos estudios se amplíen a modelos *in vivo* que puedan arrojar más luz a la comprensión de los procesos de neuroinvasión del WNV.

Está generalmente aceptado que en el ser humano aproximadamente el 80% de las personas infectadas por WNV no desarrollan síntomas clínicos. De aquellos que sí desarrollan síntomas, la mayoría experimentan una enfermedad febril a la que se le denomina “Fiebre por virus West Nile”. Este proceso febril es el síndrome clínico predominante en las personas infectadas. Los datos nos dicen que menos del 1% de ellos desarrollan una forma clínica más grave, neuroinvasiva, conocida como “enfermedad neurológica por virus West Nile”.

La enfermedad neuroinvasiva ocurre cuando el WNV es capaz de invadir el SNC, y puede manifestarse principalmente como (resumido en Sejvar JJ, 2014):

- a) Meningitis: las personas afectadas pueden desarrollar varios síntomas como rigidez en la nuca, dolor de cabeza o fotofobia. Generalmente se asocia con un desenlace favorable de la enfermedad.
- b) Encefalitis: Es más común en personas de edad avanzada (>55 años) o inmunodeprimidos. Pueden desarrollarse temblores, sobre todo en la parte

superior del cuerpo que pueden desaparecer con el tiempo aunque en algunos individuos persiste a pesar de recuperarse de la encefalitis.

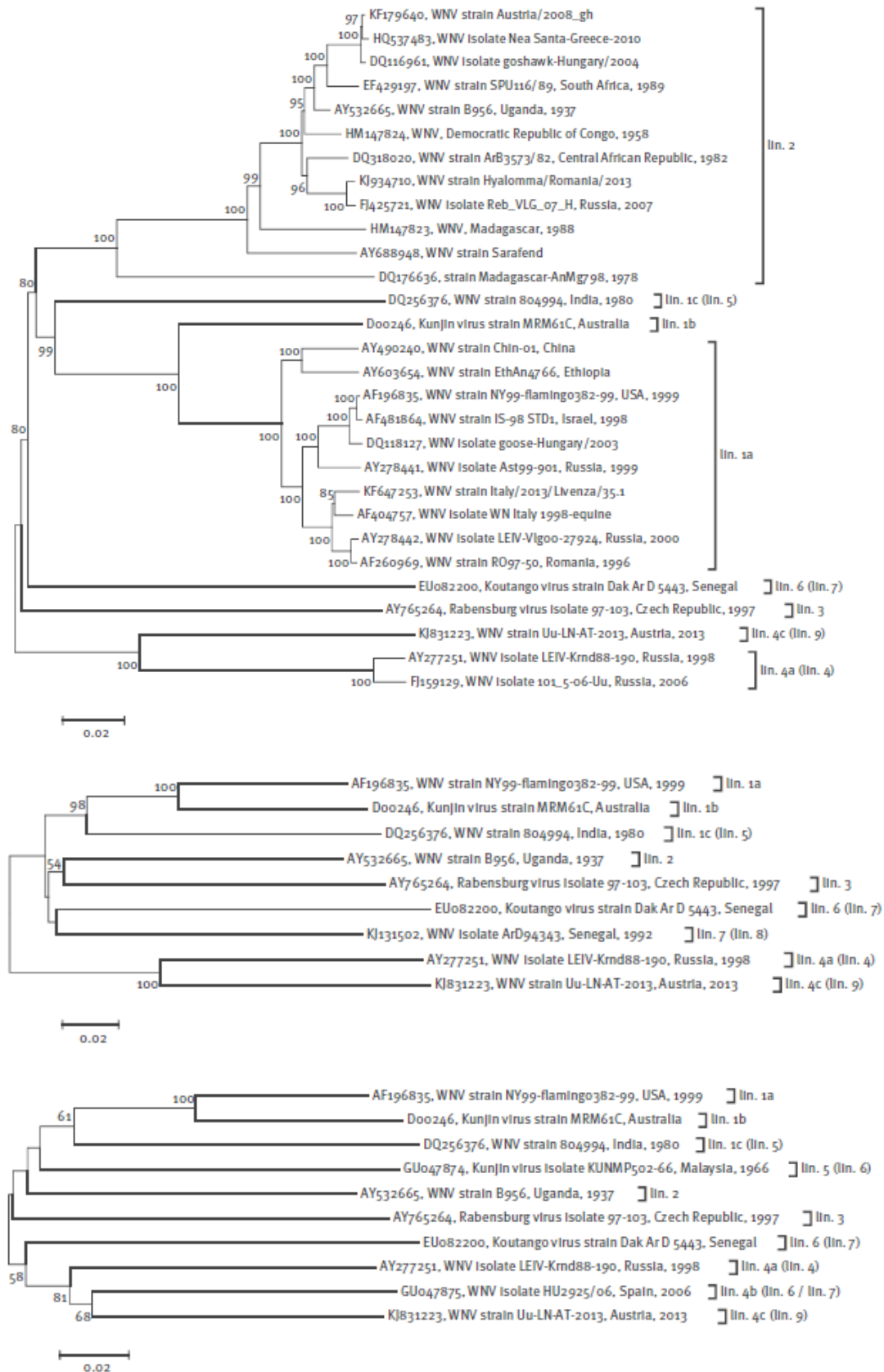
- c) Poliomielitis: El síntoma más evidente es la debilidad muscular que puede ser parcial o completa ya que se ven afectadas las neuronas motoras de la médula espinal. La manifestación más severa de la enfermedad es la que afecta a los músculos respiratorios pudiendo derivar en fallo respiratorio con necesidad de ventilación asistida.

Taxonomía, filogenia y distribución geográfica del WNV

WNV pertenece a la familia *Flaviviridae* y se engloba dentro del género *Flavivirus* que consiste en más de 50 especies de virus. La mayoría de los virus que pertenecen a este género se transmiten por picadura de artrópodos y de ellos algunos tienen importancia clínica, como por ejemplo los virus del dengue (DENV), Zika (ZIKV), fiebre amarilla (YFV), encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) y encefalitis japonesa (JEV), además del WNV.

Los estudios de reactividad cruzada en las pruebas de seroneutralización agrupan al WNV dentro del serocomplejo de la encefalitis japonesa (JEV) junto con los virus de la encefalitis japonesa, valle de Murray (MVEV), encefalitis de Saint Louis (SLEV), y Usutu (USUV) (Calisher CH et al., 1989). La clasificación en linajes genéticos del WNV está basada en el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los distintos aislados del virus (Figura 4).

Figura 4. Armonización de la numeración de los linajes de WNV basada en el análisis filogenético (Rizzoli A et al., 2015).



Hasta el momento se han descrito diversos linajes genéticos (Tabla 2) cuya clasificación está actualmente en revisión (Berthet FX et al., 1997; Mackenzie JS et al., 2009, Rizzoli A et al., 2015). Es importante destacar que por su distribución geográfica, su capacidad de dispersión y su importancia clínica, la mayoría de los autores coinciden en la existencia de dos linajes principales, el linaje 1 y el linaje 2 (Lanciotti RS et al., 2002; Kramer LD et al., 2008; Rizzoli A et al., 2015). En la Tabla 2 se muestra la clasificación de linajes propuesta en Rizzoli A et al., 2015.

Tabla 2. Clasificación de los linajes genéticos del WNV (Rizzoli A et al., 2015).

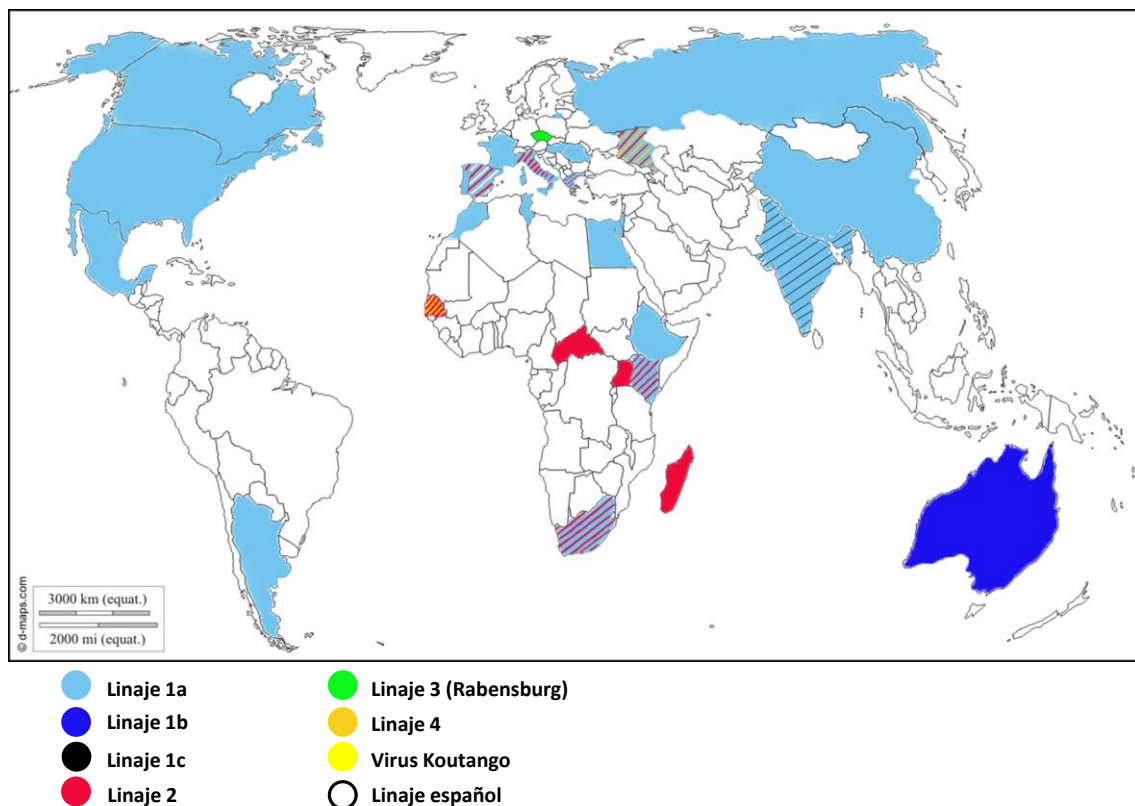
Numeración de linaje sugerida	Otras nomenclaturas en la literatura	Cepa representativa	Número de acceso en GenBank	Nota	Referencia
Linaje 1a	Linaje 1	NY99-flamingo382-99, New York, 1999	AF196835	Linaje más ampliamente distribuido	Lanciotti et al., 1999
Linaje 1b	Linaje 1	Kunjin MRM61C, Australia, 1960	D00246	Cepas de virus Kunjin, Australia	Coia et al., 1988
Linaje 1c	Linaje 5	804994, India 1980	DQ256376	Sólo se ha hallado en la India	Bondre et al., 2007
Linaje 2	No	B956, Uganda 1937	AY532665	Segundo linaje más distribuido	Smithburn et al., 1940
Linaje 3	No	Rabensburg virus 97-103, Czech Republic 1997	AY765264	Sólo se ha hallado en Europa central	Bakonyi et al., 2005
Linaje 4a	Linaje 4	LEIV-Krmd88-190, Russia 1998	AY277251	Aislado originalmente en garrapatas Dermacentor	Lvov et al., 2004
Linaje 4b	Linaje 6/Linaje 7	HU2925/06, Spain	GU047875	Sólo está disponible parte de la secuencia	Vázquez et al., 2010
Linaje 4c	Linaje 9	WNV-UU-LN-AT-2013, Austria 2013	KJ831223	Identificado en mosquitos Uranotaenia	Pachler et al., 2014
Linaje 5	Linaje 6	Kunjin virus KUN MP502-66, Malaysia 1966	GU047874, HQ840762	Sólo está disponible partes de las secuencias	Vázquez et al., 2010
Linaje 6	Linaje 7	Dak Ar D 5443, Senegal	EU082200	Virus Koutango	No disponible
Linaje 7	Linaje 8	ArD94343, Senegal 1992	KJ131502	Sólo está disponible parte de la secuencia	Fall et al., 2014

Diversos autores han señalado que no existe correlación entre la distribución geográfica de los distintos linajes y su clasificación filogenética. Este hecho sugiere un mecanismo de dispersión a larga distancia del virus, en el que es probable que las aves y sus movimientos migratorios jueguen un papel relevante (Berthet FX et al., 1997) (ver Figuras 5 y 7).

De todos los linajes, el más extensamente estudiado es el linaje 1, por ser el que mayor rango de distribución geográfica presenta en la actualidad y el que más

brotes ha producido históricamente (ver Figura 5), incluyendo el brote en humanos más importante hasta la fecha, iniciado en Nueva York, en 1999 y que en poco tiempo se extendió por Norteamérica causando decenas de miles de casos de enfermedad neuroinvasiva en humanos, además de afectar de forma masiva a caballos y aves silvestres (revisado en Murray KO et al., 2010). Sin embargo, en los últimos 5 años el linaje 2 ha cobrado mucha importancia en Europa debido a los brotes detectados primariamente en Hungría y Rusia en 2004, de forma simultánea, y que posteriormente se han ido extendiendo por una vasta área geográfica que abarca Austria, Grecia, Serbia, Croacia, Bulgaria, Italia, Rumania y Este de Rusia (Revisado en: Hernández-Triana LM et al., 2014).

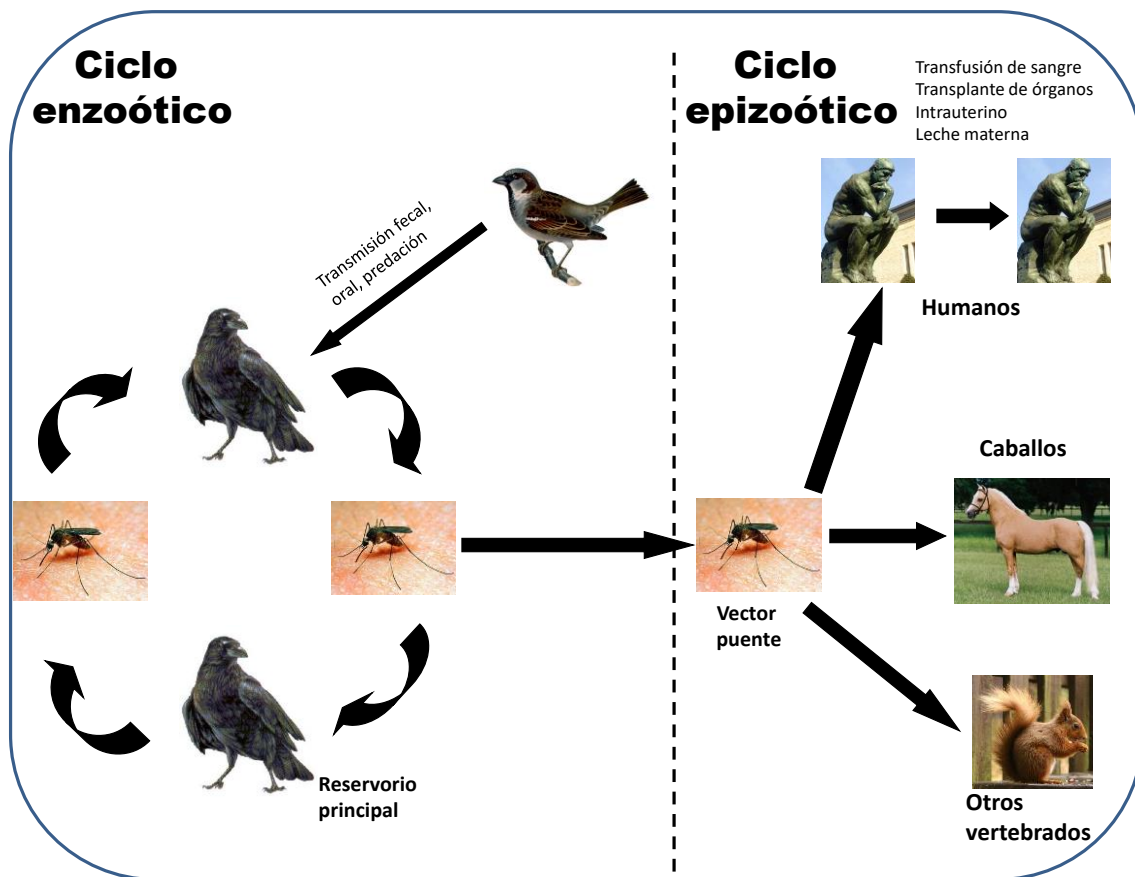
Figura 5. Distribución del WNV en el mundo (adaptado de Pesko KN et al., 2012).



Ciclo de transmisión del WNV

La primera vez que se describieron los aspectos ecológicos que involucran a mosquitos, aves y al hombre en el ciclo biológico del WNV fue en Egipto en la década de 1950 (Taylor RM et al., 1956). En aquellos estudios se determinó por primera vez que el WNV se mantiene en la naturaleza en un ciclo rural o enzoótico mosquito-ave-mosquito, donde los mosquitos actúan de vectores de transmisión y las aves de reservorios principales (ver Figura 6). Cuando el ciclo normal de transmisión se ve alterado (por factores hoy por hoy desconocidos en gran medida), se produce lo que se denomina desbordamiento (o “spillover”), que conduce al WNV a infectar a hospedadores no habituales iniciándose un ciclo epizoótico o urbano, dentro del cual existe riesgo de transmisión para el ser humano y para determinados animales domésticos, como los caballos (Tempelis CH et al., 1965; Edman JD et al., 1968; Ulbert S, 2011) (ver Figura 6). En el ciclo de transmisión del WNV los mamíferos son considerados hospedadores accidentales o en fondo de saco, es decir, no desarrollan viremias capaces de transmitir el patógeno a un mosquito competente que se alimente de su sangre y pueda continuar con el ciclo de transmisión del virus. Si bien (como se señaló anteriormente) las causas exactas por las que se producen los desbordamientos son en gran parte desconocidas, se ha sugerido que ciertos cambios en los patrones de alimentación de los mosquitos, principalmente por el descenso de la abundancia de aves, podrían actuar de desencadenante (Kilpatrick AM et al., 2006a). A las especies de mosquito responsables de esta migración alimenticia de aves a mamíferos se les denomina vectores puente. Varios estudios apuntan a *Cx. pipiens* como una de las especies que pueden actuar como vector puente (Thiemann TC et al., 2009; Hamer GL et al., 2008; Kilpatrick AM et al., 2005).

Figura 6. Esquema del ciclo enzoótico y epidémico del WNV (autoría propia).



Papel de los mosquitos en la transmisión del WNV

Los mosquitos capaces de transmitir el virus son considerados vectores competentes y son aquellos que replican el virus en cantidad suficiente y que de forma sistémica lo diseminan por todo su organismo hasta alcanzar las glándulas salivares. Los principales vectores del WNV son los mosquitos ornitófilos del género *Culex* (Komar N, 2003a; Zeller HG et al., 2004). Numerosos estudios y autores indican que la especie más importante de mosquito competente en Europa y Norteamérica es *Culex pipiens*, si bien existen otras especies de mosquitos que contribuyen a la transmisión del WNV (Fyodorova MV et al., 2006; Kilpatrick AM et al., 2005; Vázquez A et al., 2011; Muñoz J et al., 2012; Engler O et al., 2013). *Cx. pipiens* es un vector abundante y ornitófilo aunque también incluye en su dieta a mamíferos y, al ser una especie

habitual en áreas urbanas, puede actuar como vector puente en humanos (Kilpatrick AM et al., 2005; Hamer GL et al., 2008 y 2009).

La complejidad de la ecología del WNV y sus dinámicas de transmisión mediada por vectores están determinadas principalmente por cuatro aspectos vinculados a los mosquitos:

1. El patrón de alimentación de los mosquitos.
2. La competencia como vectores.
3. La abundancia de mosquitos.
4. La prevalencia de la infección en los mosquitos.

De todos estos factores, el patrón de alimentación de los mosquitos es de vital importancia. Además de la abundancia de hospedadores competentes y su biodiversidad, el factor clave en los patrones de transmisión viene determinado por el número de contactos vector-hospedador y la proporción que una especie de ave competente concreta representa en el total de la dieta del mosquito. Conocer estos datos es de especial importancia para entender las dinámicas de transmisión de WNV en determinadas zonas y, por tanto, para la implementación de los programas de vigilancia y prevención (Kilpatrick AM et al., 2006b, Hamer GL et al., 2009 y 2011). En relación al número de contactos vector-hospedador se ha acuñado el término super dispersador (del inglés “super-spreader”) para designar a una especie de ave que sería la responsable de la mayoría de los mosquitos infectados en una comunidad heterogénea de hospedadores (Kilpatrick AM et al., 2006b). Más adelante se ahondará en este concepto en el apartado *Papel de las aves en la transmisión del WNV*. El estudio exhaustivo de la ecología de los vectores ayuda a detectar aquellas especies que pueden suponer un riesgo para los humanos y que por definición actuarían como vectores puente (Kilpatrick AM et al., 2005 y 2006a).

En relación al origen Paleártico y/o Neártico de los mosquitos y la forma en la que esto afecta a sus patrones de alimentación existen estudios con resultados contradictorios. Fonseca en su estudio de 2004 describe cómo las poblaciones de mosquitos de la especie *Cx. pipiens* de origen europeo (Paleárticos) se alimentan

exclusivamente de aves mientras que los *Cx pipiens* norteamericanos (Neárticos) se alimentan indistintamente de aves y mamíferos. Concluye que este comportamiento podría explicar la distinta epidemiología observada entre Europa y Norteamérica. Sin embargo, los trabajos de Spielman sugieren que los mosquitos europeos se alimentan tanto de aves como de mamíferos y que estas diferencias en los patrones de alimentación no existen (Fonseca DM et al., 2004; Spielman A et al., 2004). Por tanto, la procedencia de los mosquitos no parece ser una explicación concluyente de las diferencias epidemiológicas en ambos territorios.

La transmisión vertical del WNV (transmisión del virus desde las hembras grávidas infectadas a su progenie) ha sido descrita experimentalmente en las especies *Cx. Pipiens* (Nelms BM et al., 2011) y *Cx. Tarsalis* (Anderson JF et al., 2012), y existe abundante evidencia indirecta (detección de WNV en mosquitos macho) de campo que indicaría que este fenómeno se da realmente en la naturaleza. En hembras de mosquito en diapausa se ha podido aislar el virus y algunos autores han propuesto la hibernación de los mosquitos como mecanismo por el cual el virus podría sobrevivir al invierno (“overwintering”) y establecerse en una región sin necesidad de ser reintroducido, tal y como ya ha sucedido en el brote de Nueva York y en los recientes brotes en Europa (Reeves WC, 1990; Monaco F et al., 2011). No obstante, la verdadera importancia de este mecanismo en la eco-epidemiología del WNV aún está por determinar.

Para finalizar este apartado, cabe destacar la influencia de, por un lado, los niveles de viremia del hospedador, y por otro, la saliva del mosquito, en la transmisión del WNV. Al nivel de viremia necesario en un hospedador para que un mosquito que se alimente de su sangre quede infectado se le denomina *umbral de infectividad*. Este umbral varía con la especie de vector estudiado. Así, para *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* este umbral es 10^5 PFU/mL (Turell MJ et al., 2000; Sardelis MR et al., 2001), para *Cx. univittatus* 10^4 PFU/mL y para *Cx. perexiguus* es $10^{4.6}$ PFU/mL (Goddard LB et al., 2002). Por este motivo, los niveles de viremia que desarrolla un hospedador vertebrado, siendo siempre un parámetro importante, puede ser un factor limitante dependiendo de la especie de mosquito que participe en el ciclo de transmisión. Por otra parte, estudios en ratones han permitido determinar que la saliva del mosquito

también influye en la transmisión de la enfermedad, favoreciendo la infección al suprimir el sistema inmune a varios niveles, produciendo mayores viremias y una neuroinvasión más rápida comparada con las inoculaciones realizadas con jeringuilla (Titus RG et al., 2006; Styer LM et al., 2011).

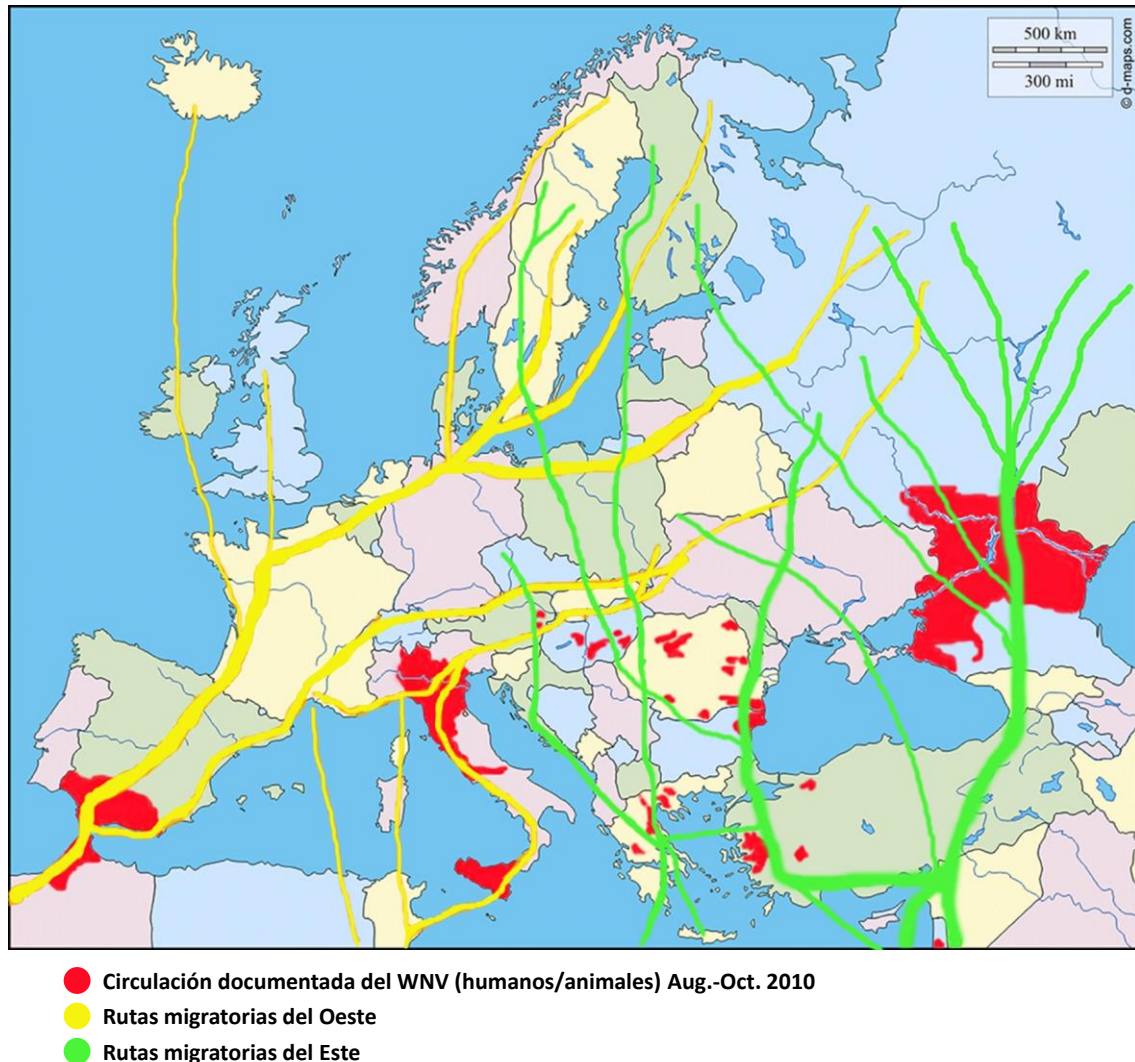
Papel de las aves en la transmisión del WNV

WNV se mantiene en la naturaleza en un ciclo de transmisión que se establece entre aves y mosquitos. Los datos existentes en el Viejo Mundo, referidos a las aves, apuntan a que la transmisión y circulación del WNV son una combinación de tres factores: aves infectadas capaces de transmitir el virus (infectivas), mosquitos ornitofílicos activos como los vectores más importantes y la transmisión del virus entre distintas especies de aves amplificadoras, no necesariamente las mismas especies que las infectivas (Rappole JH et al., 2000). Los brotes del WNV ocurren debido a la presencia de poblaciones de aves infectadas donde la elevada viremia juega un papel clave para que los mosquitos, del género *Culex* principalmente, se infecten al alimentarse de éstas.

Por otra parte, el estatus inmunológico de una población de aves contribuye a prevenir el restablecimiento de un ciclo enzoótico amplificado que pueda afectar a la población humana en una región concreta (Weiss D et al., 2000). El contacto con cepas del WNV circulantes o probablemente con otros flavivirus (inmunidad cruzada por flavivirus heterólogos) puede producir un efecto protector, reduciendo sustancialmente los niveles de viremia de las aves expuestas (Fang Y et al., 2006). Este hecho, el historial de contactos de las aves europeas con múltiples flavivirus, se ha usado como hipótesis para explicar la baja virulencia del WNV en Europa frente a la alta virulencia exhibida en los brotes del WNV en Norteamérica (Beck C et al., 2013). Es más, la protección cruzada que proporcionan determinadas cepas (Kunjin-6453 y Kenya-3829) de baja patogenicidad frente a la infección con una cepa de alta patogenicidad (NY99-4132) ya ha sido demostrada en el cuervo americano (*Corvus brachyrhynchos*) (Brault AC et al., 2004).

La diseminación espacial y la introducción del WNV en nuevas áreas se debe probablemente, entre otros factores, a la influencia de los movimientos de aves, migratorias o no. Se ha propuesto que las aves migratorias de larga distancia juegan un papel decisivo en la dispersión espacial del WNV (Liu R et al., 2006). Lo cierto es que aves migratorias de diferentes especies se exponen a la infección por virus West Nile probablemente en sus lugares de invernada al sur, y ello sugiere la posibilidad de que tengan un papel en la dispersión del WNV a través de Europa Occidental (Figuerola J et al., 2008; López G et al., 2008), Europa Oriental (Hubálek Z et al., 2008), Oriente Medio (Malkinson M et al., 2002a y 2002b) y Norteamérica (Peterson AT et al., 2003). La hipótesis de que la introducción del WNV en Europa es consecuencia del paso de las aves migratorias que vienen de África se sustenta por un lado en pruebas serológicas en este tipo de aves que ayudan a explicar no sólo la dispersión geográfica del virus sino también la coincidencia en el tiempo de los brotes y el paso de estas aves durante su migración primaveral (Calistri P et al., 2010; López G et al., 2008; Rappole JH et al., 2003), y por otro lado en las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas del virus West Nile aisladas en Europa y África (Cicozzi M et al., 2014; Zehender G et al., 2011).

Figura 7. Rutas migratorias de las aves en Europa y brotes del WNV en 2010 (adaptado de proyecto EpiSouth-Plus website).



Aunque la capacidad del WNV para desplazarse a través de movimientos de aves, es generalmente aceptada, quedan importantes lagunas de conocimiento por esclarecer acerca de cómo, cuándo y desde donde es desplazado el virus (Rizzoli A et al., 2015). Por ejemplo, se desconoce qué especies de aves están involucradas, dónde adquieren la infección, el recorrido exacto que hacen, qué paradas realizan y la relevancia de éstas en las translocaciones de WNV, la distancia a la que pueden desplazar el virus, si el estar infectadas merma su capacidad de desplazamiento, etc. Igualmente, queda por explicar cómo un virus portado por un ave migrando desde el sur (África Subsahariana) en primavera puede iniciar un ciclo de transmisión en

Europa, en una estación en la que los vectores escasean o están virtualmente ausentes en grandes áreas. En realidad, el desplazamiento del WNV en sentido opuesto es mucho más probable: las aves migratorias regresan a sus lugares de invernada a finales de verano y principios del otoño, en plena temporada de transmisión del virus en Europa. De hecho, la única prueba empírica directa de la implicación de aves migratorias en el desplazamiento del WNV entre Europa y África se obtuvo en Israel en 1998 (Malkinson M et al., 2002a). Una bandada de cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*) fue hallada en el desierto de Neguev, muchas con síntomas de infección por WNV, pudiendo aislarse el virus de varias de ellas. La bandada procedía de Centroeuropa y se dirigía a África a invernar. Hoy día, tras casi dos décadas de circulación continuada del WNV en amplias zonas de Europa meridional, central y oriental, existen pocas dudas de que el virus ha sido capaz de establecer circulación endémica en las zonas afectadas, donde se mantiene sin necesidad de tener que ser introducido desde África. La visión actual es que los brotes observados no tienen por qué estar vinculados al paso de aves migratorias, sino que se trata del resultado de una introducción, seguida de varias temporadas de transmisión “silenciosa” y dispersión local (donde pueden estar involucrados movimientos de aves), hasta producir los brotes de enfermedad en especies susceptibles (caballos y humanos fundamentalmente), que son resultado de un fenómeno de “desbordamiento” (“spillover”). Prueba de ello es que el número de brotes en Europa en los últimos años se cuenta por centenares, mientras que el número de introducciones que permiten concluir los datos de comparación filogenética de los aislados víricos es mucho menor (Sotelo E et al., 2011b). A pesar de estas lagunas y consideraciones, el estudio de Paz y Semenza plantea una conexión entre la migración y los brotes en humanos de Israel, Turquía, Rumanía, Rusia, Italia y España (Paz S y Semenza JC, 2013). Por supuesto, las largas migraciones no son el único mecanismo de dispersión posible para grandes distancias, es posible que desplazamientos cortos y consecutivos de aves, migratorias o no, puedan ejercer el mismo papel (Rappole JH et al., 2003).

Otro factor que influye en la transmisión del WNV es la biodiversidad de especies de aves, o si se quiere, la heterogeneidad de hospedadores en un área geográfica determinada. De este modo, y asumiendo que las especies de aves

altamente competentes son mucho menos abundantes que las que no lo son dentro de una comunidad de aves, se ha descrito que una mayor biodiversidad actuaría de “efecto diluyente” en la transmisión del WNV a varios niveles. Una gran diversidad de especies disminuye las tasas de contacto entre el vector y el hospedador competente. De este modo, el índice de competencia de una comunidad de aves (la suma de los índices de competencia de cada especie ajustado por la abundancia relativa de cada una de ellas) se ve disminuida a medida que aumenta la biodiversidad de las especies que la componen (Ezenwa VO et al., 2006; Allan BF et al., 2009). Esto puede observarse en Sudamérica, a medida que nos aproximamos a los trópicos el número de especies de aves aumenta y disminuyen los casos de enfermedad asociados al WNV. Esta hipótesis de la abundancia de aves como “efecto diluyente” de la transmisión del WNV necesita de más estudios para ser contrastada. También hay que tener en cuenta que la abundancia de los hospedadores, competentes o no, en un habitat determinado está regulada mediante interacciones ecológicas específicas como la predación o la competencia por recursos limitados.

Recientemente se ha acuñado el término “superdispersador” (del inglés “super-spreader”), mencionado en el apartado anterior. Este término hace referencia a aquellas especies de aves que por sus características son las responsables de la mayoría de las infecciones de mosquitos por WNV (infecciones secundarias). Dos características han de coincidir para considerar un ave como superdispersadora: la primera, que la infección que desarrolle sea asintomática o en todo caso produzca signos leves, pero que además alcance viremias muy elevadas y duraderas; la segunda, que sea un hospedador preferente en la dieta de los mosquitos. En Norteamérica, para las áreas de Maryland y Washington D.C., se ha descrito al *Turdus migratorius* como un superdispersador debido a que reúne estas dos cualidades. (Kilpatrick AM et al., 2006b; Hamer GL et al., 2009 y 2011). Los resultados de Hamer y Kilpatrick indican que entre el 84% y el 95,8% de los mosquitos infectados (*Cx. pipiens*) se deben al contacto con dos especies de aves, el *T. migratorius* y *P. domesticus*, siendo el *T. migratorius* el responsable de la mayoría de los mosquitos que resultan infectados. En Europa, en la provincia de Trento (Italia), se ha observado que la mayoría de los mosquitos infectados (*Cx. pipiens*) entre junio y julio se alimentan de *T. merula* y *P. domesticus*

(Roiz D et al., 2011). Aunque debido a la abundancia relativa de ambas especies, el verdadero superdispersador es éste último, ya que *T. merula* es la especie más abundante. Como ya se ha comentado en la sección anterior, establecer qué especies de ave son responsables de la mayoría de las infecciones secundarias en mosquitos es importante para entender los ciclos de transmisión en determinadas áreas y poder implementar programas de vigilancia y prevención.

Los passeriformes y el gorrión común en relación con el WNV

Los passeriformes (orden *Passeriformes*) son un gran orden de aves que abarca a más de la mitad de las especies de aves del mundo. El grupo fue bautizado por el nombre latino del gorrión (*Passer*), y por ello significa “los que tienen forma de gorrión”. Está dividido en tres subórdenes: dos mayoritarios, *Passeri* y *Tyranni*, y un tercero más reducido, *Acanthisitti*, que en conjunto constituyen el grupo de mayor diversidad entre las aves en la actualidad. Los passeriformes se conocen comúnmente como pájaros, aves canoras o pájaros cantores. Los pájaros son el grupo de vertebrados terrestres más diversificado, con más de 5.700 especies identificadas, lo que aproximadamente duplica el número de especies del orden de mamíferos más abundante, los roedores (orden *Rodentia*, 2.280 especies). Consta de más de 110 familias, ocupando en este sentido el segundo puesto entre los vertebrados tras los perciformes. Su éxito evolutivo se debe a diversas adaptaciones, que comprenden desde su capacidad para posarse en los árboles, los usos de sus cantos, su inteligencia o la complejidad y diversidad de sus nidos.

En relación con el WNV, los passeriformes incluyen especies de aves altamente competentes para la transmisión, actuando como reservorios naturales en el ciclo de transmisión del virus (Komar N et al., 2003a). Estas aves jugaron un papel importante para la dispersión del WNV a través de EE.UU (Rappole JH et al., 2000). Dentro del orden de los passeriformes, las familias que alcanzan títulos virales en sangre más altos durante la infección son: *Corvidae* (cuervos), *Fringillidae* (fringílidos) y *Passeridae* (gorriones) (Komar N et al., 2003b). Sin embargo, la mortalidad es bien distinta. En

infecciones experimentales con la cepa NY99 la mortalidad en cuervos americanos (*Corvus brachyrhynchos*) alcanza el 100 % (Brault AC et al., 2004 y 2007) mientras que los gorriones son menos susceptibles a la enfermedad. Los datos de mortalidad en gorriones, por lo general, varían entre un 10-50 % dependiendo del autor consultado (Komar N et al., 2003b, Langevin SA et al., 2005; Nemeth NM et al., 2008, 2009 y 2009b). Algunos autores achacan al diferente origen de ambas especies esta diferencia de mortalidad, siendo el cuervo americano una especie “naïve” sin exposición natural histórica al WNV; mientras que el gorrión presente en Norteamérica es una especie introducida desde Europa, donde el WNV ha estado circulando probablemente durante cientos de años (Hayes CG et al., 2001).

El gorrión común (*Passer domesticus*)

El gorrión común (*Passer domesticus*), también llamado pardal, es una especie de ave paseriforme de la familia *Passeridae*. Es pequeño, está adaptado al hábitat urbano y acostumbrado a vivir cerca del ser humano pues los entornos humanizados le proporcionan estructuras donde anidar, abundancia de comida y agua. Aunque es originario de Eurasia y el Norte de África, el gorrión común se encuentra distribuido por todo el mundo, pues ha sido introducido por el ser humano en el resto de los continentes, a excepción de la Antártida. Concretamente en los EE.UU. fue introducido alrededor de 1851 en la ciudad de Nueva York, más tarde, esta medida se siguió en otras ciudades de EE.UU. donde es conocido como gorrión inglés (Moulton MP et al., 2010).

El gorrión común es un ave gregaria y generalmente sedentaria, aunque se ha observado que cruzan el Estrecho de Gibraltar entre la segunda quincena de septiembre y la primera de noviembre. Hasta qué punto estos flujos son verdadera migración o movimientos dispersivos se desconoce. A menor escala el gorrión común desarrolla dos tipos de movimientos: los rutinarios que corresponden a aves adultas, sobre todo durante la época reproductora, y los de forrajeo y dormidero que se producen fuera de la época reproductora.

En lo que se refiere a infecciones víricas, el gorrión común ha sido implicado en la transmisión del virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV) (Gruwell JA et al., 2000) y del virus de la encefalitis equina del Oeste (WEEV) (Holden P et al., 1973). Sobre el WNV, ya se ha mencionado con anterioridad que el gorrión común infectado por WNV alcanza viremias muy altas y sostenidas en el tiempo durante la fase aguda de la infección. Su competencia como hospedador unida al hecho de que es un ave que habita próxima al hombre, preferentemente en áreas urbanas, sugiere que podría tener un papel epidemiológico con repercusiones para la salud pública. En la ciudad de Nueva York, durante el brote de 1999, los gorriones pudieron contribuir de manera muy importante a la transmisión del WNV al estar frecuentemente expuestos al virus y ser más abundantes que otras especies de aves (Komar N et al., 2001). A estos factores se le une el hecho de que especies de mosquito como *Cx. pipiens*, que han sido sugeridas por algunos autores como vector puente, tienen afinidad por alimentarse del gorrión común.

La alta mortalidad en aves silvestres observada durante el brote de Nueva York provocó la necesidad de profundizar en el conocimiento de la biología del WNV en sus reservorios naturales. Como consecuencia, la mayoría de los estudios sobre la virulencia del WNV en aves, tanto infecciones experimentales como naturales, se han realizado en especies originarias de Norteamérica (Neárticas) y aproximadamente en dos tercios de las publicaciones sobre aves silvestres infectadas experimentalmente con WNV se ha usado la cepa NY99 (Perez-Ramirez E et al., 2014). Por el contrario, las investigaciones en aves de origen europeo (Paleárticas) con cepas circulantes en este continente son muchos más escasas (Dridi M et al., 2013; Sotelo E et al., 2011a; Ziegler U et al., 2013). Aun así, los resultados de estos experimentos muestran que las aves europeas son igualmente susceptibles a la enfermedad y que algunas cepas virales europeas pueden llegar a ser tan patogénicas como las norteamericanas (Sotelo E et al., 2011a). Por tanto, las diferencias eco-epidemiológicas del WNV en Norteamérica y Europa, en relación a la mortalidad y virulencia en aves, aún requieren una explicación satisfactoria. Para avanzar en este aspecto son necesarios más estudios con aves y cepas de origen europeo, pues es sabido que la mayoría de estudios han sido

desarrollados en aves y cepas de virus de origen norteamericano (Perez-Ramirez E et al., 2014).

Existen otros aspectos relacionados con la infección del WNV en el gorrión común que han suscitado el interés de los investigadores como son la persistencia del virus, la inmunidad generada por anticuerpos, el tropismo y la patogenia del virus durante la infección, la mortalidad y su relación con la edad, la seroprevalencia y la elección del hospedador por los mosquitos en su dieta. A continuación se comentan brevemente algunos de ellos.

Los estudios sobre persistencia del virus en aves apuntan a que el mecanismo más plausible de supervivencia del virus al invierno (“overwintering”) es la depredación de gorriones por aves más que la infección de mosquitos al alimentarse de gorriones portadores del virus (Wheeler SS et al., 2012; Nemeth NM et al., 2009).

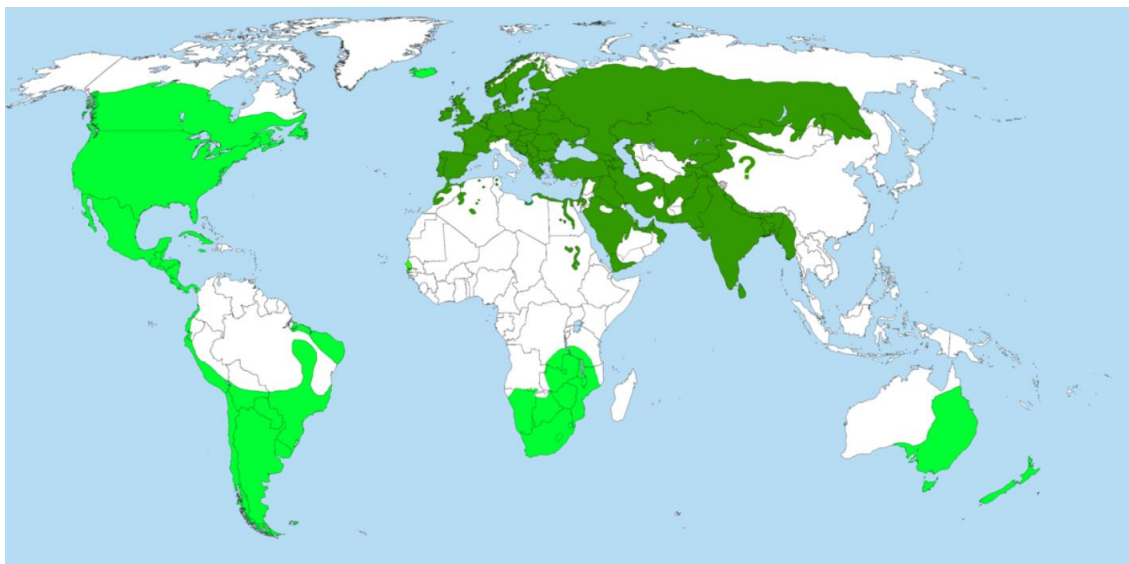
Los estudios de tropismo y patología confirman que la infección en el gorrión común es sistémica, con afectación del sistema nervioso central (vasculitis) y colonización de diversos órganos como el hígado, bazo y corazón (O’Brien VA et al., 2010; Komar N et al., 2003b).

La mortalidad del gorrión común en la fase aguda de la infección varía entre un 10 % y un 50 %. Muchos de estos estudios han sido desarrollados con una muestra pequeña de individuos (n = 6-11) donde la mortalidad está comprendida entre el 27 % y el 50 % (Komar N et al., 2003b; Langevin SA et al., 2005; Nemeth NM et al., 2008). Por otro lado, los estudios con un número mayor de gorriones (n = 35-115) contemplan una mortalidad entre el 10% y el 23% (Nemeth NM et al., 2009a y 2009b). Si bien en estos estudios hay diferencias en la dosis viral inoculada (pfu) o en el método de infección utilizado, existen evidencias de que los individuos de menor edad sufren una mortalidad mayor (Nemeth NM et al., 2008 y 2009a).

Finalmente, en cuanto a la preferencia del gorrión común en la dieta de los mosquitos y la seroprevalencia, mencionar que el gorrión común, junto con el mirlo, conforman casi en exclusiva la dieta de los mosquitos *Cx. pipiens* en ciertas regiones de Italia donde exhiben una alta seroprevalencia frente al WNV (Roiz D et al., 2012).

En resumen, el gorrión común es un modelo animal útil, adecuado y de gran interés para el estudio de la virulencia de las distintas cepas de WNV por su capacidad para replicar el virus, su aparente papel en la transmisión de la enfermedad, su amplia distribución geográfica, con presencia en todos aquellos continentes donde se halla el WNV (Figuras 5 y 8), su abundancia y la proximidad al hombre. Además, su pequeño tamaño facilita su manejo y su mantenimiento en cautividad en el laboratorio.

Figura 8. Distribución en el mundo del gorrión común (Glutz von Blotzheim UN y Bauer KM, 1997).



Verde oscuro: Autóctono

Verde claro: Introducido

Competencia e índice de competencia del hospedador

La competencia puede ser definida para vectores, hospedadores y comunidades de aves.

a) Vector competente para la transmisión del WNV

Normalmente son mosquitos del género *Culex* spp. Un vector competente es aquel que puede transmitir la enfermedad a un hospedador del que se alimenta. Por tanto, la competencia para un vector es definida como la capacidad de replicar el virus de forma sistémica a un nivel tal que éste pueda alcanzar las glándulas salivares. Para que esto suceda el virus debe atravesar determinadas estructuras que actúan a modo de barreras en el interior del mosquito. La primera es la lámina basal de la pared del intestino medio (Scott TW et al., 1989). Una vez superada ésta, el virus puede acceder a la hemolinfa y viajar a otros tejidos hasta alcanzar las glándulas salivares donde, de nuevo, debe cruzar la lámina basal de las células salivares para poder acceder a ellas. La amplificación del virus en el mosquito y la diseminación hasta las glándulas salivares son dependientes de la temperatura ambiente, de tal forma que cuanto mayor es la temperatura más rápido es el proceso de propagación y diseminación. Al llegar a las glándulas salivares el mosquito es capaz de transmitirlo a través de su picadura. El índice de competencia varía con la especie de mosquito estudiada (Sardelis MR et al., 2001; Goddard LB et al., 2002).

b) Hospedador competente para la transmisión del WNV

Es aquel hospedador vertebrado en el cual, durante la infección, el virus alcanza concentraciones en sangre capaces de infectar a un mosquito que se alimente de él. A este nivel de viremia se le denomina umbral de infectividad y es distinto para cada especie de mosquito. Por tanto, la competencia de un hospedador está determinada por la intensidad y duración de la viremia que desarrolla. Como ya se señaló anteriormente, esta situación se da generalmente en determinados tipos de aves, consideradas reservorios epidemiológicos del virus.

Índice de competencia del hospedador (Ci)

Hay varias maneras de calcular el índice de competencia de un hospedador (Komar N et al., 2003b; Kilpatrick AM et al., 2007). Los cálculos usados en los capítulos 3 y 4 de esta Tesis se basan en la fórmula publicada por Komar y colaboradores (Komar N et al., 2003b) y que define el índice de competencia de un hospedador como el número de mosquitos por día que resultarían infectados al alimentarse de una especie de ave infectada. Es un indicador de la capacidad de transmisión y/o diseminación del WNV a partir de un ave y en relación a una especie de vector determinada. Komar ha calculado el índice de competencia para docenas de especies de aves (Komar N et al., 2003b). Para ello, en su estudio publicado en 2003 definió el índice de competencia de un hospedador como el producto de tres variables:

Ci: s*i*d

Donde:

- (s) ó susceptibilidad es la proporción de aves que quedan infectadas como resultado de la exposición a mosquitos infectivos.
- (i) ó infectividad es un parámetro que indica el número diario de mosquitos que quedan infectados tras alimentarse de un hospedador durante el periodo que dura la viremia infecciosa.
- (d) ó duración de la viremia infecciosa es el número de días que un ave mantiene una viremia capaz de infectar a una especie de mosquito o, si se quiere, la duración del umbral de infectividad.

Para calcular el índice de competencia de diversas especies de aves para la transmisión del WNV, Komar usó los valores de infectividad “i” para *Cx. pipiens* publicados por Turell en el año 2000 (Turell MJ et al., 2000). Turell estableció la infectividad como una variable que depende del título viral en sangre del hospedador, y fijó un *umbral de infectividad* para *Cx. pipiens* de 10^5 PFU/mL, por debajo del cual los mosquitos no quedan infectados. Existen distintos umbrales de infectividad

dependiendo de la especie de mosquito, tal y como se mencionó en el apartado dedicado al papel de los mosquitos en el ciclo de transmisión.

Los niveles de viremia y la duración de ésta varían con la especie de ave, por lo que cada especie tiene un C_i distinto. De todos los órdenes de aves estudiados en Komar N et al., 2003b puede decirse en general que destacan dos, *passeriformes* y *charadriiformes*, al incluir a las aves que poseen los índices de competencia más altos, aunque existen notables diferencias entre especies pertenecientes a estos dos taxones, incluso dentro de la misma familia (Komar N et al., 2003b).

Tabla 3. Tabla de consulta de curva estándar que relaciona el título de la viremia con la infectividad para *Culex pipiens*. Anexo D de Turell y cols. (Turell MJ et al., 2000).

Viremia	Infectividad	Viremia	Infectividad	Viremia	Infectividad	Viremia	Infectividad
5.0	0.02	7.0	0.22	9.0	0.42	11.0	0.62
5.1	0.03	7.1	0.23	9.1	0.43	11.1	0.63
5.2	0.04	7.2	0.24	9.2	0.44	11.2	0.64
5.3	0.05	7.3	0.25	9.3	0.45	11.3	0.65
5.4	0.06	7.4	0.26	9.4	0.46	11.4	0.66
5.5	0.07	7.5	0.27	9.5	0.47	11.5	0.67
5.6	0.08	7.6	0.28	9.6	0.48	11.6	0.68
5.7	0.09	7.7	0.29	9.7	0.49	11.7	0.69
5.8	0.10	7.8	0.30	9.8	0.50	11.8	0.70
5.9	0.11	7.9	0.31	9.9	0.51	11.9	0.71
6.0	0.12	8.0	0.32	10.0	0.52	12.0	0.72
6.1	0.13	8.1	0.33	10.1	0.53		
6.2	0.14	8.2	0.34	10.2	0.54		
6.3	0.15	8.3	0.35	10.3	0.55		
6.4	0.16	8.4	0.36	10.4	0.56		
6.5	0.17	8.5	0.37	10.5	0.57		
6.6	0.18	8.6	0.38	10.6	0.58		
6.7	0.19	8.7	0.39	10.7	0.59		
6.8	0.20	8.8	0.40	10.8	0.60		
6.9	0.21	8.9	0.41	10.9	0.61		

c) Competencia de comunidad

Se trata de un parámetro análogo al índice de competencia (C_i) para una especie descrito anteriormente, pero aplicable a las comunidades de aves. Es definida como la suma de los productos de la abundancia de cada especie de ave y su índice de competencia como hospedador (Allan BF et al., 2009).

Dinámicas de transmisión de WNV en distintos territorios: América, Europa y la cuenca mediterránea

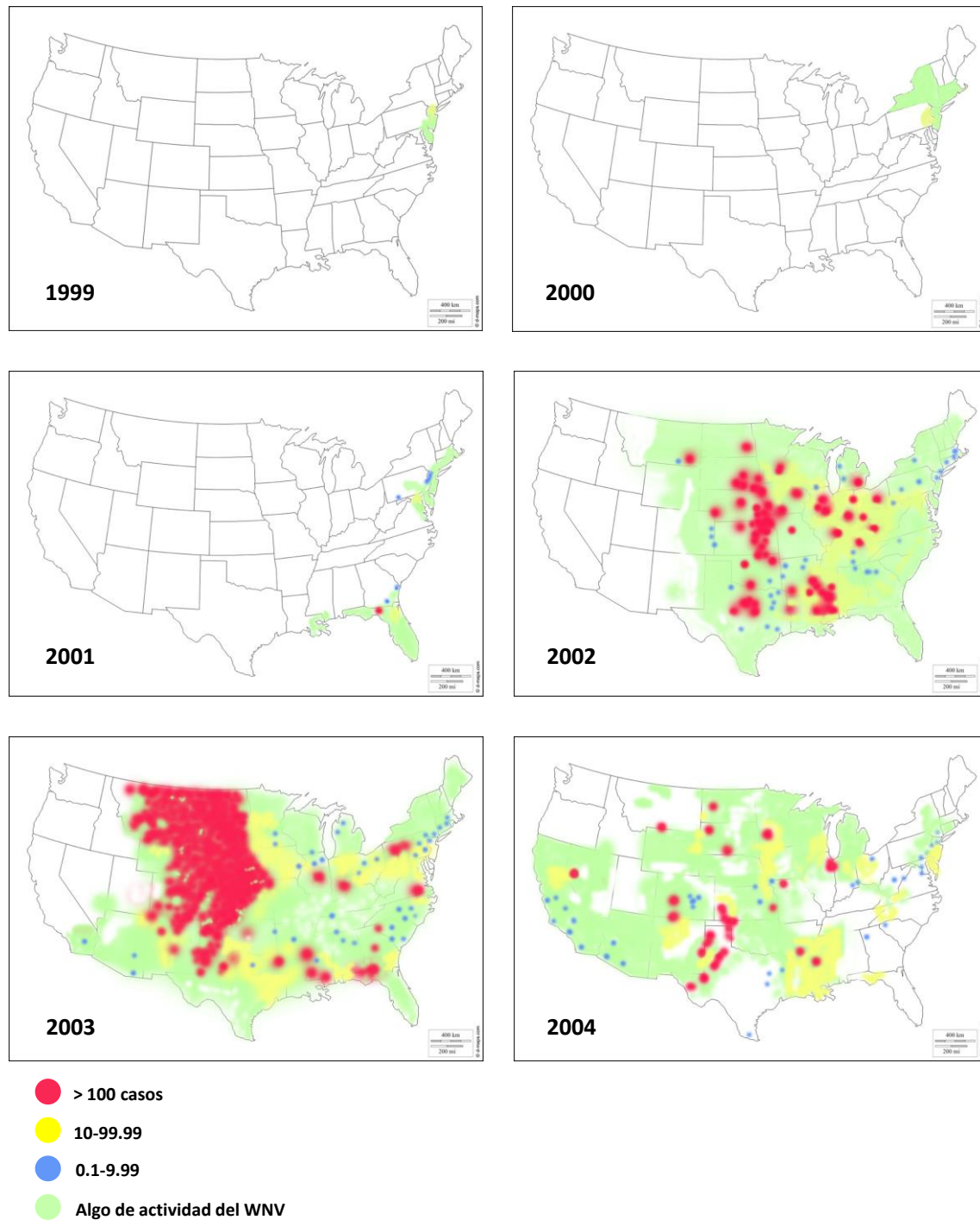
El WNV fue aislado por primera vez en 1937 en Uganda, en el distrito de West Nile (según la división territorial vigente bajo la administración colonial británica de aquel entonces, hoy día provincia de Arusha), a partir de la sangre de una mujer que presentaba un cuadro febril (Smithburn KC et al., 1940). Actualmente es uno de los arbovirus más extendidos del planeta.

En la década de 1950 el WNV se detecta en Israel y Egipto, estos brotes ayudaron a profundizar en el conocimiento de la ecología del WNV (Taylor RM et al., 1956). En Europa los primeros casos de WNV fueron en equinos y se documentaron entre los años 1962 y 1971 en la región de la Camarga francesa y el sur de Portugal, respectivamente. Así, los primeros aislados de WNV en Europa datan de esta época (Francia 1962, Portugal 1971) (Hubalek Z et al., 1999a y 1999b). Después de un periodo de 23 años de inactividad, el WNV reemerge en Europa y en la cuenca del Mediterráneo a finales de los años 90 (Murgue B et al., 2001), concretamente en el Norte de África (Argelia, 1994; Marruecos, 1996 y Túnez, 1997) y en Europa del Este (Rumania, 1996 y Rusia, 1997). Al mismo tiempo el WNV es detectado en Italia e Israel (1998) y en Norteamérica (Nueva York, 1999). Hasta la década de los noventa la enfermedad provocada por el WNV se consideró de poca importancia y de escasa gravedad. Fue a partir de los brotes de Rumanía (Bucarest 1996), Rusia (Volgogrado 1997), Israel (1998) y Estados Unidos (1999), notablemente virulentos, con centenares de casos humanos, cuando la concepción sobre la enfermedad cambió notablemente (Tsai TF et al., 1998; Lanciotti RS et al., 1999; Hayes CG et al., 2001).

En Estados Unidos, entre 1999 y 2016 se ha detectado la enfermedad en más de 44.000 seres humanos, causando la muerte a más de 2.000 de ellos (CDC, 2016). En EE.UU. el virus sobrevivió al invierno de 1999 y los siguientes hasta hoy, de manera que ya es considerado endémico en amplias áreas del país. En tan sólo cuatro años desde su aparición se extendió de costa a costa (ver Figura 9) causando epidemias regionales en 2002 y 2003. Fuera de EE.UU., en el continente americano el WNV fue

detectado en Canadá en 2001 y desde entonces se ha expandido desde Canadá hasta Argentina.

Figura 9. Expansión del WNV en EE.UU. Casos de enfermedad neuroinvasiva declarados entre 1999-2004 (adaptado de Hayes EB et al., 2005).



En lo que respecta a Europa, hasta 2010 la mayoría de los brotes registrados han sido causados por aislados pertenecientes al linaje 1. El primer brote epidémico se registró entre los años 1962 y 1965 en la región de la Camarga francesa en caballos y humanos, desapareciendo entre 1971 y 1996. Los brotes de Rusia de 1999 y de Rumanía de 1996 son los más graves de los aislados englobados en el linaje 1. No obstante, en las últimas dos décadas el número y la gravedad de los brotes han ido en aumento, sobre todo en aquellas regiones donde la enfermedad ya había sido registrada con anterioridad como son Francia, Italia, Grecia, Túnez, Hungría, España, Rumanía, Portugal. Estudios filogenéticos indican que el virus se ha vuelto endémico en Grecia, Italia, España, Portugal, Francia y Rumanía (Calistri P et al., 2010, Barzon L et al., 2013; Sambri V et al., 2013). Así mismo, el número de casos de fiebre producida por el WNV entre 2010 y 2015 ha sufrido un repunte (ver Tabla 4).

En cuanto al linaje 2, se consideraba restringido al África Subsahariana y Madagascar (con la excepción de un aislado de 1968 en Chipre (McMullen AR et al., 2013) pero desde 2004, año en que se aisló por primera vez en aves en Hungría, ha sido detectado en varias ocasiones en Europa. Aislados pertenecientes a este linaje son responsables de importantes brotes en Grecia, Rumanía, Italia y Balcanes, donde la frecuencia y virulencia de los brotes es cada vez mayor (Barzon L et al., 2013; Papa A et al., 2010; Sirbu A et al., 2011; ECDC, 2016). De tal forma, el brote de 2010 en Grecia es el de mayor gravedad causado por un virus del linaje 2 que se haya registrado en Europa, con 262 casos confirmados y 33 muertes. En Italia desde 2011 aislados pertenecientes a ambos linajes están co-circulando en las regiones del norte del país (Barzon L et al., 2013). En regiones donde nunca se había reportado actividad del WNV, como en los Balcanes, se han registrado en los últimos años brotes causados por virus del linaje 2. Todo ello coincide con un aumento de la actividad en la última década de aislados pertenecientes al Linaje 2 de WNV, reportándose esta actividad en Italia, Grecia, Austria, Hungría, República Checa y Rusia entre otros (ECDC,2016).

Tabla 4. Casos de encefalitis en humanos provocada por el WNV en Europa y los países colindantes, 2010-2015 (ECDC, 2016).

País	Número de casos					
	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Bulgaria	0	0	2	0	0	2
Rep. Checa	0	0	0	1	0	0
Rusia	419	153	447	177	29	39
Grecia	262	100	161	86	15	0
Israel	105	39	83	63	17	125
Rumanía	57	11	14	24	23	19
Turquia	47	3	0	0	0	0
Austria	0	0	0	0	1	7
Italia	6	14	50	69	24	60
España	2	0	0	0	0	0
Francia	0	0	0	0	0	1
Portugal	0	0	0	0	0	1
Hungría	18	3	17	31	11	18
Ucrania	0	8	12	1	0	0
Albania	0	2	0	0	0	0
Macedonia	0	4	6	1	0	0
Argelia	0	0	1	0	0	0
Túnez	0	3	63	6	0	0
Eslovenia	0	0	0	1	0	0
Serbia	0	0	69	302	76	28
Croacia	0	0	5	16	0	0
Bosnia Hercegovina	0	0	0	3	13	0
Kosovo	0	0	4	0	0	0
Montenegro	0	0	1	4	0	0
Territorio Palestino	0	0	2	0	1	1
Total	1.016	340	937	785	210	301

Viejo Mundo vs. Nuevo Mundo: Breve resumen de las causas de la diferente eco-epidemiología.

Ya se ha mencionado anteriormente que la eco-epidemiología del WNV en Europa y Norteamérica difieren en algunos aspectos. El WNV es un virus re-emergente en Europa y en la cuenca del Mediterráneo, donde da lugar a brotes en general menos extensos que en Norteamérica, siendo así mismo su incidencia significativamente menor (CDC, 2016 y ECDC, 2016) si bien en los últimos años las diferencias en este sentido se han reducido. Además, la mortalidad en aves asociada al WNV en Europa es muy escasa mientras que en Norteamérica, desde que el WNV fue detectado por primera vez en 1999, se produce una alta mortalidad en (CDC, 2016 y ECDC, 2016). Varias son las causas que se han apuntado para explicar estas diferencias:

1. Las cepas virales que circulan por Norteamérica podrían presentar una mayor virulencia que las cepas europeas. Hay que tener en cuenta a este respecto que las cepas circulantes en Europa, donde se ha observado circulación de hasta 4 linajes genéticos distintos (Rizzoli A et al., 2015), presentan una mayor diversidad genética que en EE.UU. donde las cepas circulantes son mucho más homogéneas, como consecuencia de que derivan de una única introducción en 1999 (May FJ et al., 2011). Existe, sin embargo, evidencia de que al menos algunas cepas circulantes en Europa son al menos tan virulentas como las cepas norteamericanas (Sotelo E et al., 2009; Perez-Ramirez E et al., 2014).
2. Las aves norteamericanas podrían ser más susceptibles a la enfermedad que las europeas debido a que su historial de contactos con el virus es más restringido. Esto implicaría que en Norteamérica la co-evolución entre aves y virus apenas ha tenido oportunidad de ocurrir, no así en Europa lo cual ha podido tener consecuencias en la selección natural de las distintas especies de aves.
3. Podría darse un distinto patrón de alimentación, quizá menos selectivo entre aves/mamíferos, en las especies de mosquitos que residen en Norteamérica, siendo las especies dominantes en Europa (*Culex* spp.) de un carácter ornitofílico más estricto (Fonseca DM et al., 2004).

4. La existencia de otros flavivirus circulantes por Europa proporcionarían protección cruzada a las aves frente al WNV.

Fruto de la diversificación y adaptación al entorno donde se propaga el WNV, las distintas variantes geográficas del virus muestran diferencias genéticas en su secuencia de aminoácidos. Los experimentos de patogenicidad en modelos animales, tanto en ratón como en aves, unidos al conocimiento detallado de la secuencia genética de los distintos aislados de WNV, han permitido proponer varios determinantes de patogenicidad. En la Tabla 5 se muestran los más importantes (Rizzoli A et al., 2015).

Tabla 5. Determinantes genéticos de patogenicidad del WNV propuestos en distintos modelos animales (Rizzoli A et al., 2015).

Región del genoma	Cambio genético	Efectos fenotípicos/mecanismos involucrados	Grupo filogenético	Modelo animal usado	Sistema experimental	Bibliografía
E	Varias, en 154-NYS(T)-156 (motivo de N-glicosilación)	Sitio de N-glicosilación suprimido; fusión inestable de péptidos E; replicación viral decrecida	Linaje 1 (clados a y b) y 2	Ratón	Mutagénesis de clones de ADNc	Beasley DW et al., 2004 y 2005
NS2A	A30P	NS1' (extensión de NS1) suprimida; alteración de los mecanismos de evasión del sistema inmune mediados por NS1	Kunjin (Linaje 1, clado b)	Ratón	Mutagénesis de clones de ADNc	Melian EB et al., 2010; Liu WJ et al., 2006
NS3	T249P	Virogénesis aumentada, replicación más eficiente a mayores temperaturas	Linaje 1, clado a	Cuervo americano	Mutagénesis de clones de ADNc	Brault et al., 2007
NS4B	C102S, P38G E249G	Impide la evasión del sistema inmune del hospedador (respuestas IFN a/b); decrecimiento de la actividad helicasa (decrecimiento de la replicación viral)	Linaje 1, clado a	Ratón	Mutagénesis de clones de ADNc	Wicker JA et al., 2006; Puig-Basagoiti F et al., 2007
3' UTR	Desconocido	Anula el ARNfs	Linaje 1, clado b	Ratón	Mutagénesis de clones de ADNc	Pijlman GP et al., 2008
5' UTR	5-AAT/TTG-52	Desconocido	Linaje 1, clado a y b	Ratón	Mutagénesis de clones de ADNc y quimeras	Audsley M et al., 2011

Uno de los determinantes de patogenicidad que más han atraído la atención de los investigadores es la sustitución de treonina (Thr) por prolina (Pro) en la proteína NS3 en la posición 249 (NS3₂₄₉). El estudio de esta mutación fue abordado por Brault en un elegante experimento con clones infecciosos en un modelo experimental de cuervo americano (Brault AC et al., 2007). En este estudio Brault fue capaz de revertir

la virulencia de la cepa de alta patogenicidad (NY99) únicamente mediante la sustitución de la prolina por treonina en dicha posición, y al contrario, la cepa de baja patogenicidad (Ken-3829) aumentó su virulencia notablemente al efectuar la sustitución contraria (treonina por prolina).

Todas las cepas norteamericanas de WNV presentan prolina en la posición NS3₂₄₉ (NS3₂₄₉P). Así mismo, esta mutación está siendo detectada recientemente en un número creciente de cepas europeas responsables de numerosos brotes, tanto en aislados pertenecientes al linaje 1 (Italy/2008, Spain/2010, entre otras) como en aislados del linaje 2 como Austria/2008 y Grecia/2010). Esto ha motivado que en general se asuma que las cepas de WNV portadoras de la mutación NS3₂₄₉P son más virulentas que las que no la poseen. Esto, que ha sido demostrado experimentalmente para el cuervo americano (Brault AC et al., 2007), no es así para otras especies analizadas, como por ejemplo, el gorrión común (Langevin SA et al., 2005), la perdiz roja (Sotelo E et al., 2011a) o el ratón (Sotelo E et al., 2009). Por todo ello hay que tomar con precaución los datos sobre patogenicidad y tener en cuenta otras características fenotípicas del WNV, entre ellas, y de modo especial, la competencia del hospedador. Cepas de igual virulencia pueden dar lugar a brotes de distinta importancia en función de la diferente competencia como hospedador que presente la especie (o especies) involucrada(s) en su ciclo de transmisión para las distintas cepas: a mayor competencia, más mosquitos resultarán infectados de cada ave individual infectada, más capacidad para diseminar el virus, y por tanto más casos cabe esperar que se produzcan.

Conclusión

El WNV es un virus con un ciclo biológico que involucra a aves y mosquitos como principales vectores. En las últimas décadas el número de brotes en Europa ha ido aumentando, así como la incidencia del virus en humanos. Es por ello que conocer los factores de transmisión y circulación del virus para un determinado territorio es clave para poder minimizar los riesgos de los brotes o intentar predecirlos. En este sentido determinar la capacidad de una especie de ave para amplificar y transmitir el virus (Ci) es uno de los pasos fundamentales en la carrera por entender el comportamiento del WNV sobre el terreno, aunque este aspecto no es el único a tener en cuenta. También es necesario averiguar qué especies de aves son las responsables de la mayoría de mosquitos infectados en un territorio determinado. Por tanto para entender de la mejor manera posible el comportamiento epidemiológico del WNV es necesario combinar los trabajos experimentales de patogenia y competencia como hospedador en aves con los estudios de campo que indaguen en los aspectos ecológicos de las relaciones entre aves y mosquitos.

La mayoría de los datos existentes en este sentido han sido aportados para aves y cepas víricas de origen norteamericano. Por el contrario, los trabajos con aves y cepas de origen europeo son mucho más escasos y pese a que su número está aumentando en los últimos años es necesario seguir averiguando las claves que permiten descifrar la eco-epidemiología del WNV.

Referencias

- Allan BF, Langerhans RB, Ryberg WA, Landesman WJ, Griffin NW, Katz RS, Oberle BJ, Schutzenhofer MR, Smyth KN, de St Maurice A, Clark L, Crooks KR, Hernandez DE, McLean RG, Ostfeld RS, Chase JM. **Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States.** *Oecologia* 2009; 158: 699–708.
- Anderson JF, Main AJ, Cheng G, Ferrandino FJ, Fikrig E. **Horizontal and vertical transmission of West Nile virus genotype NY99 by *Culex salinarius* and genotypes NY99 and WN02 by *Culex tarsalis*.** *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86(1):134-9.
- Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S: **Usutu virus. An emerging flavivirus in Europe.** *Viruses* 2015; 7: 219-238.
- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. **Novel flavivirus or new lineage of West Nile Virus, central Europe.** *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 225–231.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N. **Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe.** *Emerg Infect Dis* 2006; 12:618-623.
- Barzon L, Papa A, Lavezzo E, Franchin E, Pacenti M, Sinigaglia A, Masi G, Trevisan M, Squarzon L, Toppo S, Papadopoulou E, Nowotny N, Ulbert S, Piralla A, Rovida F, Baldanti F, Percivalle E, Palù G. **Phylogenetic characterization of Central/Southern European lineage 2 West Nile virus: analysis of human outbreaks in Italy and Greece, 2013-2014.** *Clin Microbiol Infect* 2015;21(12):1122-1132.
- Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CYH, Schneider BS, Smith DR, Gromowski GD, Higgs S, Kinney RM, Barrett ADT. **Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains.** *J Virol* 2005; 79: 8339-8347.
- Beck C, Jiménez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparç-Goffart I, Zientara S, Jourdain E, Lecollinet S. **Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of west nile disease.** *Int J Environ Res PublicHealth* 2013; 10: 6049–6083.

- Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. **Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses.** J Gen Virol 1997; 78: 2293–2297.
- Bowen RA, Nemeth NM. **Experimental infections with West Nile virus.** Curr Opin Infect Dis 2007; 20: 293–297.
- Brault AC, Langevin SA, Bowen RA, Panella NA, Biggerstaff BJ, Miller BR, Komar N. **Differential virulence of West Nile strains for American crows.** Emerg Infect Dis 2004; 10: 2161–2168.
- Brault AC, Huang CYH, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, Panella NA, Holmes EC Powers AM, Miller BR. **A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows.** Nat Genet 2007; 39: 1162–1166.
- Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. **Interleukin-1 beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice.** J Invest Dermatol 2001; 117 (3): 702-709.
- Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. **West Nile Virus.** Lancet Infect Dis 2002, 2:519-529.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. **Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with poly- clonal antisera.** J Gen Virol 1989; 70: 37–43.
- Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, Lelli R. **Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin.** Open Virol J 2010; 4: 29–37.
- Chu JJ, Ng ML. **Interaction of West Nile virus with $\alpha v \beta 3$ integrin mediates virus entry into cells.** J Biol Chem 2004; 279: 54533–54541.
- CDC, 2016: <http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cummapsdata.html>
- Ciccozzi M, Peletto S, Cellaa E, Giovanettia M, Laic A, Gabanellic E, Acutis PL, Modesto P, Rezza G, Platonovd A E, Lo Prestia A, Zehender G. **Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2, Infection.** Genetics and Evolution 2013; 17: 46-50.

- De Filette M, Ulbert S, Diamond M and Sanders N. **Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination.** Vet Res 2012; 43: 16-31.
- Dridi M, Vangeluwe D, Lecollinet S, van den Berg T, Lambrecht B. **Experimental infection of Carrion crows (*Corvus corone*) with two European West Nile virus (WNV) strains.** Vet Microbiol 2013; 165: 160–166.
- ECDC, 2016: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/pages/index.aspx. Acceso 9 ene 2017.
- Edman JD, Taylor DJ. **Culex nigripalpus: seasonal shift in bird-mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis.** Science 1968; 161: 67–68.
- Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, Medlock J, Vaux A, Wilson AJ, Werner D, Jöst H, Goffredo M, Capelli G, Federici V, Tonolla M, Patocchi N, Flacio E, Portmann J, Rossi-Pedruzzi A, Mourelatos S, Ruiz S, Vázquez A, Calzolari M, Bonilauri P, Dottori M, Schaffner F, Mathis A, Johnson N: **European surveillance for West Nile virus in mosquito populations.** Int J Environ Res Public Health 2013; 10(10): 4869-4895.
- EpiSouth Plus website <http://www.episouthnetwork.org/> Acceso 6 nov 2016.
- Ezenwa VO, Godsey MS, King RJ, Guptill SC. **Avian diversity and West Nile Virus: Testing associations between biodiversity and infectious disease risk.** Proc R Soc B 2006; 273: 109–117.
- Fang Y, Reisen WK. **Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches.** Am J Trop Med Hyg 2006; 75: 480–485.
- Figuerola J, Jimenez-Clavero MA, Lopez G, Rubio C, Soriguer RC, Gómez-Tejedor C, Tenorio A. **Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain.** Vet Microbiol 2008; 132: 39-46.
- Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, Bulgakova TA, Ivanitsky AV, Platonova OV, Platonov AE. **Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes.** J Med Entomol 2006; 43(3): 552-563.

- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson RC. **Emerging vectors in the Culex pipiens complex**. Science 2004; 303: 1535–1538.
- Glutz von Blotzheim UN y Bauer KM. **Handbuch der Vögel Mitteleuropas**. Wiesbaden, AULA-Verlag, 1997.
- Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. **Vector Competence of California Mosquitoes for West Nile virus**. Emerg Infect Dis 2002; 8 (12): 1385-1391.
- Gruwell JA, Fogarty CL, Bennett SG, Challet GL, Vanderpool KS, Jozan M, Webb JP Jr. **Role of peridomestic birds in the transmission of St. Louis encephalitis virus in southern California**. J Wildl Dis 2000; 36: 13 – 34 .
- Gubler DJ. **The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere**. Clin Infect. Dis 2007; 45(8): 1039–1046.
- Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. **The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein**. Virology 1992; 191: 921–931.
- Hamer GL, Kitron UD, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Goldberg TL, Walker ED. **Culex pipiens (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans**. J Med Entomol 2008; 45: 125–128.
- Hamer GL, Kitron UD, Goldberg TL, Brawn JD, Loss SR, Ruiz MO, Hayes DB, Walker ED. **Host Selection by Culex pipiens Mosquitoes and West Nile Virus Amplification**. Am J Trop Med Hyg 2009; 80(2): 268–278.
- Hamer GL, Chaves LF, Anderson TK, Kitron UD, Brawn JD, Ruiz MO, Loss SR, Walker ED, Goldberg TL. **Fine-Scale Variation in Vector Host Use and Force of Infection Drive Localized Patterns of West Nile Virus Transmission**. PLoS ONE 2011; 6 (8) e23767.
- Hayes CG. **West Nile Fever**. In **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. 1988, pp. 59–89. Edited by T. P. Monath. Boca Raton, Fla. : CRC Press.
- Hayes CG. **West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999**. Ann N Y Acad Sci 2001; 951, 25–37.

- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL: **Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease**. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8):1167-1173.
- Hernández-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, Carnell G, Fooks AR, Johnson N. **Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease**. *Front Public Health* 2014; 2:271-279.
- Holden P, Francy DB, Mitchell CJ, Hayes RO, Lazuick JS, Hughes TB. **House sparrows, *Passer domesticus* (L), as hosts of arboviruses in Hale County, Texas. II. Laboratory studies with western equine encephalitis virus**. *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22: 254–262.
- Hubalek Z, Halouzka J. **West Nile fever a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe**. *Emerg Infect Dis* 1999a; 5(5): 643-650.
- Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z. **West Nile fever in Czechland**. *Emerg Infect Dis* 1999b; 5(4): 594-595.
- Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z, Sikutová S, Rudolf I, Honza M, Janková J, Chytil J, Marec F, Sitko J: **Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic)**. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 659-66.
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P. **West Nile Virus Risk Assessment and the Bridge Vector Paradigm**. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 425-429.
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P. **West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior**. *PLoS Biol* 2006a; 4: 606–610.
- Kilpatrick AM, Daszak P, Jones MJ, Marra PP, Kramer LD. **Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission**. *Proc R Soc B Biol Sci* 2006b; 273: 2327–2333.
- Kilpatrick AM, LaDeau SL, Marra PP. **Ecology of West Nile virus transmission and its impact on birds in the western hemisphere**. *Auk* 2007; 124: 1121–1136.
- Kolman JM. **Serologic examination of some domestic animals from South Moravia on the presence of antibodies to selected arboviruses of the A, B, California and Bunyamwera groups**. *Folia Parasitol* 1973; 20: 353–360.

- Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. **Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999.** Emerg Infect Dis 2001; 7: 621–625.
- Komar N. **West Nile virus: epidemiology and ecology in North America.** Adv Virus Res 2003a; 61: 185–234.
- Komar N, Langevin SA, Hinten S, Nemeth NM, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen RA, Bunning M. **Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus.** Emerg Infect Dis 2003b; 9: 311–322.
- Kramer LD and Bernard KA. **West Nile virus infection in birds and mammals.** Ann N Y Acad Sci 2001; 951: 84-93.
- Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. **A global perspective on the epidemiology of West Nile virus.** Annu Rev Entomol 2008; 53: 61–81.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. **Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States.** Science 1999; 286: 2333-2337.
- Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT. **Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East.** Virology 2002; 298(1): 96–105.
- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA, Komar N. **Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*).** Am J Trop Med Hyg 2005; 72: 99–102.
- Lim SM, Koraka P, Osterhaus A, Martina B. **West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis.** Viruses 2011; 3: 811-828.
- Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY, Bernard KA. **Keratinocytes are cell targets of west nile virus in vivo.** J. Virol 2011; 85: 5197–5201.
- Liu R, Shuai J, Wu J, Zhu H. **Modeling spatial spread of West Nile Virus and impact of directional dispersal of birds.** Math BioSci Eng 2006; 3: 145–160.

- Lopez G, Jimenez-Clavero MA, Tejedor CG, Soriguer R, Figuerola J. **Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds.** Vector Borne Zoonotic Dis 2008; 8: 615-21.
- Mackenzie JS, Williams DT. **The zoonotic flaviviruses of southern, south- eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses.** Zoonoses Public Health 2009; 56: 338-356.
- Malkinson M, Banet C. **The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa.** Curr Top Microbiol Immunol 2002a; 267: 309–322.
- Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, Deubel V. **Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks.** Emerg Infect Dis 2002b; 8: 392–397.
- May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. **Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas.** J Virol 2011; 85: 2964-2974.
- McMullen AR, Albayrak H, May FJ, Davis CT, Beasley DW, Barrett AD. **Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus.** J Gen Virol 2013; 94(2): 318-325.
- Monaco F, Savini G, Calistri P, Polci A, Pinoni C, Bruno R, Lelli R: **2009 West Nile disease epidemic in Italy: First evidence of overwintering in Western Europe?** Res Vet Sci 2011; 91(2):321-326.
- Moulton MP, Cropper WP, Avery ML, Moulton LE. **The earliest house sparrow introductions to North America.** Biol Invasions 2010; 12: 2955–2958.
- Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. **Structure of West Nile virus.** Science 2003; 302:248.
- Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, Vázquez A, Figuerola J. **Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain.** PLoS One 2012; 7(6): e39549.
- Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. **West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000.** Ann NY Acad Sci 2001; 951: 117-126.
- Murray KO, Mertens E, Despres P. **West Nile virus and its emergence in the United States of America.** Vet Res 2010; 41(6):67-81.

- Nelms BM, Kothera L, Thiemann TC, Macedo PA, Savage HM, Reisen WK. **Phenotypic variation among *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) populations from the Sacramento Valley, California: horizontal and vertical transmission of West Nile virus, diapause potential, autogeny, and host selection.** J Gen Virol 2011; 92(11): 2512-2522.
- Nemeth NM, Gould D, Bowen RA, Komar N. **Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species.** J Wildl Dis 2006; 42: 1–13.
- Nemeth NM, Oesterle PT and Bowen RA. **Passive Immunity to West Nile Virus Provides Limited Protection in a Common Passerine Species.** Am J Trop Med Hyg 2008; 79: 283-290.
- Nemeth NM, Young G, Ndaluka C, Bielefeldt-Ohmann H, Komar N, Bowen RA. **Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*).** Arch Virol 2009a; 154: 783–789.
- Nemeth NM, Oesterle PT and Bowen RA. **Humoral Immunity to West Nile Virus Is Long-Lasting and Protective in the House Sparrow.** Am J Trop Med Hyg 2009b; 80: 864-869.
- O'Brien VA, Meteyer CU, Reisen WK, Ip HS, Brown CR. **Prevalence and pathology of West Nile virus in naturally infected house sparrows, western Nebraska, 2008.** Am J Trop Med Hyg 2010; 82: 937–944.
- Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. **Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013.** Emerg Infect Dis 2014; 20(12): 2119-2122.
- Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, Theocharopoulos G, Chrysagis D, Vassiliadou E, Kamaria F, Liona A, Mellou K, Saroglou G, Panagiotopoulos T. **Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010.** Euro Surveill 2010; 34: 1-5.
- Paz S, Semenza JC: **Environmental Drivers of West Nile Fever Epidemiology in Europe and Western Asia—A Review.** Int J Environ Res Public Health 2013; 10: 3543-3562
- Perez-Ramirez E, Llorente F, and Jiménez-Clavero MA. **Experimental infections of West Nile virus in wild bird.** Viruses 2014, 6(2): 752-781.
- Pesko KN, Ebel GD. **West Nile virus population genetics and evolution.** Infect Genet Evol 2012; 12(2):181-190.

- Petersen LR, Roehrig JT. **West Nile Virus: a reemerging global pathogen**. Emer Infect Dis 2001; 7: 611–614.
- Peterson AT, Vieglais DA, Andreasen JK. **Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile Virus in North America**. Vector Borne Zoonot Dis 2003; 3: 27–37.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. **Migratory birds and spread of West Nile Virus in the western Hemisphere**. Emerg Infect Dis 2000; 6: 319–328.
- Rappole JH, Hubalek Z. **Migratory birds and West Nile Virus**. J Appl Microbiol 2003; 94: 47–58.
- Rappole JH, Compton BW, Leimgruber P, Robertson J, King DI, Renner SC. **Modeling movement of West Nile virus in the western hemisphere**. Vector Borne Zoonot Dis 2006; 6: 128–139.
- Reeves WC (1990) **Overwintering of arboviruses**. In: Reeves WC (ed) **Epidemiology and control of mosquito-borne arboviruses in California, 1943–1987**. California Mosquito and Vector Control Association, Sacramento, 357–382.
- Roiz D, Vazquez A, Rosà R, Muñoz J, Arnoldi D, Rosso F, Figuerola J, Tenorio A, Rizzoli A. **Blood meal analysis, flavivirus screening, and influence of meteorological variables on the dynamics of potential mosquito vectors of West Nile virus in northern Italy**. J Vector Ecol 201; 37 (1): 20-28.
- Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. **Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein**. J Virol 2006; 80: 4623–4632.
- Rizzoli A, Jimenez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, Martina B, Moreno A, Nowotny N, Pardigon N, Sanders N, Ulbert S, Tenorio A. **The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities**. Euro Surveill 2015;20(20).
- Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G. **West Nile Virus in Europe: Emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, prevention**. Clin Microbiol Infec 2013; (8): 699-704.
- Samuel MA and Diamond MS. **Pathogenesis of West Nile Virus Infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion**. J Virol 2006; 9349-9360.

- Sardelis MR, Turell MJ, Dohm DJ, O'Guinn ML. **Vector competence of selected North American Culex and Coquillettidia mosquitoes for West Nile virus.** Emerg Infect Dis 2001; 7: 1018–1022.
- Scott TW, Weaver SC. **Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission.** Adv Virus Res 1989; 37: 277-328.
- Sejvar JJ. **Clinical Manifestation and Outcomes of West Nile Virus Infection.** Viruses 2014; 6: 606-623.
- Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vazquez A, Tenorio A, Reboreanu R, Niedrig M, Nicolescu G, Pistol A. **Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010.** Euro Surveill 2011; 16(2).
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH: African A. **A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda.** Am J Trop Med Hyg 1940; 20: 471–492.
- Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Agüero M, Hoefle U, Blanco JM, Jiménez-Clavero MA: **Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nilevirus eco-epidemiology in the Western Mediterranean.** Virology 2009; 395(2): 289-297.
- Sotelo E, Gutierrez-Guzmán AV, Del Amo J, Llorente F, El-Harrak M, Pérez-Ramírez E, Blanco JM, Höfle U, Jiménez-Clavero MÁ. **Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge.** Vet Res 2011a; 42: 11-19.
- Sotelo E, Fernández-Pinero J, Llorente F, Vázquez A, Moreno A, Agüero M, Cordioli P, Tenorio A, Jiménez-Clavero MÁ. **Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus strains (1996-2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions?** J Gen Virol 2011b Nov;92(11): 2512-2522.
- Sotelo E, Llorente F, Rebollo B, Camunas A, Venteo A, Gallardo C, Lubisi A, Rodriguez MJ, Sanz AJ, Figuerola J, Jimenez-Clavero MA. **Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus.** J Virol Methods 2011c; 174: 35-41.
- Spielman A, Andreadis TG, Apperson CS, Cornel AJ, Day JF, Edman JD, Fish D, Harrington LC, Kiszewski AE, Lampman R, Lanzaro GC, Munstermann LE, Nasci RS, Norris DE, Novak RJ, Pollack RJ, Reisen WK, Reiter P, H. M. Savage, Tabachnick WJ, Wesson DM, Fonseca DM,

- Keyghobadi N, Malcolm CA, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson RC. **Outbreak of West Nile virus in North America**. Science 2004; 306: 1473–1475.
- Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. **Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin**. J Virol 1997; 71: 8475–8481.
- Styer LM, Lim PY, Louie KL, Albright RG, Kramer LD, Bernard KA. **Mosquito Saliva Causes Enhancement of West Nile Virus Infection in Mice**. J Virol 2011; 85: 1517–1527.
- Suen WW, Prow NA, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. **Mechanism of West Nile Virus Neuroinvasion: A Critical Appraisal**. Viruses 2014, 6: 2796-2825.
- Suthar MS, Diamond MS, Gale M Jr. **West Nile virus infection and immunity**. Nat Rev Microbiol 2013; 11(2): 115-128.
- Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS, Rizk F. **A study of the ecology of West Nile virus in Egypt**. Am J Trop Med Hyg 1956; 5: 579–620.
- Tempelis CH, Reeves WC, Bellamy RE, Lofy MF. **A 3-year study of feeding habits of Culex tarsalis in Kern county California**. Am J Trop Med Hyg 1965; 14: 170–177.
- Thiemann TC, Lemenager DA, Kluh S, Carroll BD, Lothrop HD, Reisen WK. **Spatial Variation in Host Feeding Patterns of Culex tarsalis and the Culex pipiens complex (Diptera: Culicidae) in California**. J Med Entomol. 2012; 49(4): 903-916.
- Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. **The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission**. Parasite Immunol 2006; 28: 131–141.
- Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. **West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania**. Lancet 1998; 352: 767-771.
- Turell MJ, O’Guinn M, Oliver J. **Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus**. Am J Trop Med Hyg 2000; 62: 413–414.
- Ulbert S. **West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen**. Intervirology 2011; 54: 171-184.
- Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, Magallanes A, Tejedor CG, Tenorio A. **Putative new lineage of West Nile virus, Spain**. Emerg Infect Dis 2010; 16: 549–552.

- Vázquez A, Ruiz S, Herrero L, Moreno J, Molero F, Magallanes A, Sánchez-Seco MP, Figuerola J, Tenorio A. **West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009.** Am J Trop Med Hyg 2011; 85(1): 178-181.
- Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan C, Phillips M, Bresnitz E, Layton M, Working. **West Nile Virus outbreak response. Clinical findings of West Nile Virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000.** Emerg Infect Dis 2001; 7: 654–658.
- Welte T, Reagan K, Fang H, Machain-Williams C, Zheng X, Mendell N, Chang GJ, Wu P, Blair CD, Wang T. **Toll-like receptor 7-Induced Immune response to cutaneous West Nile virus Infection.** J Gen Virol 2009; 90 (11): 2660-2668.
- Wheeler SS, Vineyard MP, Woods LW, Reisen WK. **Dynamics of West Nile Virus Persistence in House Sparrows (*Passer domesticus*).** PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(10): e1860.
- Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM. **Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs.** Am J Trop Med Hyg 1955; 4: 872-888.
- Zehender G, Ebranati E, Bernini F, Presti AL, Rezza G, Delogu M, Galli M, Ciccozzi M. **Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin.** Infect Genet Evol 2011; 11(5): 863–868.
- Zeller HG, Schuffenecker I. **West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 147–56.
- Ziegler U, Angenvoort J, Fischer D, Fast C, Eiden M, Rodriguez AV, Revilla-Fernández S, Nowotny N, de la Fuente JG, Lierz M, Groschup MH. **Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons.** Vet Mic 2013; 161: 263–273.

Capítulo II

A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus.

Una novedosa RT-PCR en tiempo real cuantitativa múltiple para la detección y diferenciación de los linajes 1 y 2 del virus West Nile, y el virus Usutu

Resumen

En los últimos años se ha reportado un incremento en Europa de la actividad de dos flavivirus, el virus West Nile (WNV) y el virus Usutu (USUV). La actual situación epidemiológica hace necesarios métodos de RT-PCR que sean capaces no sólo de detectar el linaje 1 (L1) del WNV, ampliamente distribuido, sino también el linaje 2 (L2). Además, la presencia en Europa del USUV, estrechamente relacionado, requiere métodos que puedan identificar esos tres flavivirus y permitan un diagnóstico diferencial eficiente y preciso. Aquí se describe una nueva RT-PCR en tiempo real, múltiple y en un sólo paso que detecta y diferencia eficientemente los linajes 1, 2 y el USUV en una sola reacción. Este ensayo está basado en diferentes cebadores y sondas fluorescentes específicas para cada virus que están marcadas con “apantalladores” de fluorescencia selectivos y no redundantes. Esto permite que la fluorescencia emitida por cada sonda, caracterizada por una longitud de onda determinada, pueda ser diferenciada. Este ensayo múltiplex resultó muy sensible para todos los virus diana; además no hubo reacciones cruzadas entre virus y el ensayo no dio señal para ningún otro virus relacionado filogenéticamente o sintomatológicamente. La cuantificación fue posible mediante el uso de ARN transcritos *in vitro* desarrollados específicamente para cada virus como número de copias estándar. Este nuevo ensayo fue validado usando diferentes tipos de muestras tanto de campo como experimentales.



A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus

Javier Del Amo^a, Elena Sotelo^a, Jovita Fernández-Pinero^a, Carmina Gallardo^a, Francisco Llorente^a, Montserrat Agüero^b, Miguel Angel Jiménez-Clavero^{a,*}

^a Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA (INIA), Valdeolmos, Spain

^b Laboratorio Central de Veterinaria, MAGRAMA, Algete, Spain

ABSTRACT

An increase in activity of two mosquito-borne flaviviruses, West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV), has been reported in Europe in recent years. The current epidemiological situation calls for RT-PCR methods that are able to detect not only the widespread lineage 1 (L1) WNV, but also lineage 2 (L2) WNV. In addition, the presence in Europe of the closely related USUV requires methods that can identify these three flaviviruses and permit an efficient and accurate differential diagnosis. Here we describe a new one-step real-time multiplex RT-PCR that detects and differentiates efficiently WNV-L1, WNV-L2 and USUV in a single reaction. The assay is based on different sets of primers and fluorogenic probes specific to each virus that are labelled with selective, non-overlapping fluorogen-quencher pairs. This enables the fluorescence emitted by each probe, characterized by distinct wavelengths, to be differentiated. This multiplex assay was very sensitive to all of the target viruses; in addition, there were no cross-reactions between the viruses and the assay did not react to any other phylogenetically or symptomatically related viruses. Quantitation was enabled through the use of *in vitro*-transcribed RNAs developed specifically for each virus as copy number standards. This new assay was validated using different types of experimental and field samples.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article history:

Received 11 October 2012
Received in revised form 22 January 2013
Accepted 21 February 2013
Available online 7 March 2013

Keywords:

Flavivirus
West Nile virus
Lineage 1
Lineage 2
Usutu virus
Real time
RT-PCR
Multiplex
Diagnosis

1. Introduction

The genus *Flavivirus*, belonging to the *Flaviviridae* family, comprises a number of enveloped, single-stranded positive-sense RNA viruses transmitted primarily by arthropod vectors (mainly ticks and mosquitoes) that bite the different species of host vertebrates. Of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are related both phylogenetically and serologically and belong to the Japanese encephalitis serocomplex, having similar transmission cycles involving birds as amplifying hosts and *Culex* mosquitoes as main vectors. WNV is recognized as an important zoonotic pathogen that causes relevant morbidity and mortality in, primarily, humans, horses and birds. USUV is known to affect mainly birds, although recent reports have found that this virus can cause encephalitis in immunocompromised patients (Cavirini et al., 2009; Pecorari et al., 2009). Thus, USUV could pose a risk for exposed human populations and as such should be regarded

as a potential threat to public health (Vazquez et al., 2011). Furthermore, USUV infections have been evidenced in healthy and sentinel horses (Savini et al., 2011), which are relevant host species for WNV. Both WNV and USUV are remarkable examples of emerging viruses that have expanded their geographical range in recent times. Currently, WNV is the most widespread arbovirus in the world (Gould et al., 2003; Kramer et al., 2008), while USUV, once confined to Africa, is currently spreading through Europe having been first detected there in 2001 in Austria (Jost et al., 2011; Vazquez et al., 2011; Weissenböck et al., 2010; Weissenböck et al., 2002).

Real-time PCR and RT-PCR methods have become essential tools in laboratory diagnosis and in the surveillance and control of infectious diseases (Hoffmann et al., 2009). Several real-time RT-PCR methods for the specific detection of WNV are currently available, above all since its detection in North America in 1999 (De Filette et al., 2012; Jimenez-Clavero et al., 2006a; Lanciotti et al., 2000; Linke et al., 2007; Zaayman et al., 2009); likewise, to date two real-time RT-PCR methods have been published for USUV (Cavirini et al., 2011; Jost et al., 2011). West Nile virus consists of two main different genetic lineages: L1, which is the most widespread of the two and occurs in all continents except for Antarctica, and L2, which was thought to be confined to Africa and Madagascar until it was

* Corresponding author at: Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA (INIA), Ctra Algete-El Casar, s/n, 28130 Valdeolmos (Madrid), Spain.
Tel.: +34 91 6202300; fax: +34 91 6202247.
E-mail address: majimenez@inia.es (M.A. Jiménez-Clavero).

first detected in Europe in 2004 (Bakonyi et al., 2006; Platonov et al., 2008). Several additional WNV lineages have been proposed: L3 (Rabensburg virus), isolated from mosquitoes in central Europe (Bakonyi et al., 2005); L4, isolated from ticks, mosquitoes and frogs in southern Russia (Lvov et al., 2004), and L5, a cluster of viruses found in India (Bondre et al., 2007). A sixth putative lineage has been described recently in Spain (Vazquez et al., 2010). Of these new proposed genetic WNV lineages, only the putative L5 has been found to be associated with human disease. To date, WNV disease outbreaks in Europe have only been caused by lineages 1 and 2 (lineage 1 has been observed for a number of decades, while lineage 2 has been introduced more recently) (Bakonyi et al., 2006; Barzon et al., 2009; Lanciotti et al., 2002; Papa et al., 2011; Platonov et al., 2008; Sirbu et al., 2011; Sotelo et al., 2009). In light of these findings, molecular detection tools have had to be adapted to this new situation. In this paper, a novel multiplex real-time RT-PCR technique is described that enables USUV and the two main lineages of WNV (L1 and L2) to be detected and differentiated. This assay was rendered quantitative by using known copy numbers of RNA transcripts designed specifically for this purpose and has proved its worth by detecting and differentiating quantitatively WNV L1, L2 and USUV in a wide range of sample types, in both separate assays and in multiplex format.

2. Materials and methods

2.1. Viruses and cells

All viral strains and isolates used in this study, along with their origins and sources and the cell types used for their propagation, are listed in Table 1. The infectious cell culture fluids were harvested, aliquoted and stored at -70°C for later use. Virus titres in infected tissue culture fluids were determined by a standard limiting dilution assay (Reed and Muench, 1938) using monolayers of the same cells employed for virus propagation. Viral titres were expressed in 50% tissue culture infectious doses (TCID_{50}) per ml. RNAs from other flaviviruses, including Dengue virus (DENV), Japanese encephalitis virus (JEV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV) and Tick-borne encephalitis virus (TBEV), were kindly provided by A. Tenorio (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain). The viral RNAs from avian influenza (AIV), African horse sickness (AHSV), Bagaza (BAGV), equine influenza (EIV), Newcastle disease (NDV), vesicular stomatitis (VSV) and Venezuelan equine encephalitis (VEEV) viruses originated from the CISA virus collection (Table 3).

2.2. Clinical and field samples, sample processing and viral RNA extraction

Tissue, feathers, oropharyngeal and cloacal swabs and blood from wild birds were obtained either from experimental (Sotelo et al., 2011c) or from natural infections in a WNV-infected golden eagle (*Aquila chrysaetos*) (Jimenez-Clavero et al., 2008), a WNV-infected magpie (*Pica pica*) and a USUV-infected spotless starling (*Sturnus unicolor*), the latter two provided by the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) (Brescia, Italy). A USUV-positive mosquito pool (*Culex pipiens*) was also provided by IZSLER. Samples from mice (*Mus musculus*) infected experimentally with WNV strains belonging to lineages 1 (strain NY99 034EDV-crow) and 2 (strain B956) were taken from a previous study (Sotelo et al., 2009). Before RNA extraction, tissues and swabs were treated as described (Sotelo et al., 2011c). Feathers were treated in the same way as tissues: calami from three feathers were taken simultaneously from the same bird and pooled in a single tube. Mosquito pools were homogenized as has been described previously (Sotelo et al., 2011b).

Viral RNA was extracted from 100 μl of tissue or feather homogenates, swab supernatants, plasma samples diluted in BA-1 buffer (Sotelo et al., 2011c) or infected tissue culture fluids using automated nucleic acid extraction (BioSprint 15 DNA Blood Kit and BioSprint 15 biorobot, QIAGEN) according to the manufacturer's instructions; the sole modification was that carrier RNA was added to the AL buffer to reach a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nucleic acids were recovered in 100 μl of deionized sterile water and then subjected to molecular analysis.

2.3. Design of primers and probes

The multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection of WNV lineages 1 and 2 and USUV combines a primer pair common to WNV L1 and L2 and two WNV lineage-specific TaqMan-MGB probes (Table 2) using a previously described method (Jimenez-Clavero et al., 2006a). However, the method was modified and each probe was labelled with a different fluorescent dye (FAM and VIC, respectively), and a new set of primers and a TaqMan-LNA probe were labelled with a third reporter dye (Cy5) for USUV detection (Table 2). The USUV primers and probe were designed manually based on the complete sequence of the USUV SAAR 1776 reference strain, available in GenBank (see Table 2 for details). A multiple alignment including the six full-length Usutu virus genome sequences available in GenBank had a 100% homology of primers

Table 1

Summary of the data on the source and origin of each viral isolate or strain used in this study, and the cell culture type used in each case for virus propagation.

Strain/isolate name (genetic lineage)	Geographic origin (species)	Year of isolation	Cell line used for virus propagation	Source of the strain/isolate
NY99 034EDV (WNV lineage 1a)	New York (American crow)	1999	Vero	Diagnostic Virology Laboratory, United States Department of Agriculture (USDA), Ames, IA, USA
E-101 (WNV lineage 1a)	Egypt (Human)	1951	Vero E6	Institut Pasteur de Lyon, France
04.05 (WNV lineage 1a)	Morocco (Horse)	2003	Vero	Biopharma, Rabat, Morocco
Ar B310 (WNV lineage 1a)	Central African Republic	1967	Vero	Centre for Ecology and Hydrology (CEH), Oxford, UK
GE-1b/B (WNV lineage 1a)	Spain (Golden eagle)	2007	BSR	Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, Spain
15803 (WNV lineage 1a)	Italy (Magpie)	2008	Vero	Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)
Kunj Jin KJ359 (WNV lineage 1b)	Australia (Horse)	1984	Vero E6	Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
B956 (WNV lineage 2)	Uganda (Human)	1937	Vero	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
Austria/2008 (WNV lineage 2)	Austria (Goshawk)	2008	Vero	Institute of Virology University of Veterinary Medicine Vienna, Austria
Rabensburg 97-103 (WNV lineage 3)	Czech Republic (<i>Culex pipiens</i>)	1997	C6-36	Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
USUV SAAR 1776	South Africa (<i>Culex naivei</i>)	1958	Vero	Centre for Ecology and Hydrology (CEH), Oxford, UK
USUV 939	Austria (Blackbird)	2001	Vero	Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Table 2
Primers and probes used in this work.

Name	Sequence and labelling ^c	Nucleotide positions
Primers		
WN-LCV-F1	5'GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA-3'	10597–10619 ^a
WN-LCV-R1	5'GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA-3'	10649–10672 ^a
USU-F	5'ACGGCCCAAGCGAACAGAC-3'	10789–10807 ^b
USU-R2	5'GGCTTGGGCGCACCTAA-3'	10862–10879 ^b
Probes		
WN-LCV-S1	5'FAM-AGGACCCACATGTT-3'-MGB	10633–10647 ^a
WN-LCV-S2	5'VIC-AGGACCCACGTGCT-3'-MGB	10633–10647 ^a
USU-S	5'CY5-CGAACTGTTCTGGAAGG-3'	10816–10832 ^b

^a Positions based on the complete sequence from WNV NY99 (GenBank, acc. no. AF196835).

^b Positions based on the complete sequence from USUV SAAR-1776 (GenBank, acc. no. AY453412).

^c MGB: minor groove binder; underlined positions indicate modified LNA (locked nucleic acid) nucleotide positions.

and probe. A BLASTn comparison of the selected primers and probe sequences with the GenBank database confirmed the specificity of primers and probes for Usutu virus.

2.4. One-step real-time RT-PCR

Real time RT-PCR was performed in a one-step format, using the QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) in either multiplex or simplex assays. For the multiplex assay, a reaction mix was prepared containing (per vial) 4 µl of sample RNA, 0.4 µM of each primer and 0.2 µM of each probe (Table 2), 0.25 µl of RT mix and 12.5 µl of 2× QuantiTect master mix, and RNase-free water to reach 25 µl. Amplification conditions consisted of a first reverse-transcription step at 50 °C for 30 min, followed by 15 min at 95 °C ('hot start') and 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The reaction was carried out using Mx3005P equipment and software (Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA). The fluorescence emitted by FAM, VIC and Cy5 was measured simultaneously and independently at the end of each cycle. For individual detection, the same protocol was used with an exception that, instead of all the primers, only a single pair of primers and a probe at a final concentration of 0.25 µM were used.

2.5. Construction of *in vitro*-transcribed RNA standards for viral RNA quantification

The amplification of each target sequence was performed by conventional RT-PCR on template RNAs from WNV L1 (strain NY99-035EDV equine), WNV L2 (strain B956) and USUV (strain SAAR-1776) using the primers indicated in Table 2: (WNV-LCV-F1/WNV-LCV-R1 for WNV L1 and L2, and USU-F/USU-R2 for USUV). To ensure the specificity of the amplification, the complete nucleotide sequences of the resulting amplification products were analyzed. The cDNAs obtained were gel-purified, quantified by spectrophotometry and stored at –20 °C until use. Each cDNA was inserted into a pGEM-T vector (Promega, USA) using a T-A cloning strategy according to the manufacturer's instructions, and transferred by electroporation into electrocompetent bacteria (One Shot TOP10 Electrocomp *Escherichia coli*, Invitrogen) for propagation. Plasmid DNA was purified from insert-containing colonies, using Sephadex Flexiprep Kit (Amersham LifeSciences, Cleveland, USA). Virus-derived cDNA inserts were revealed by conventional PCR using specific primers (as above). The homogeneity of the plasmid preparations was assessed by agarose gel electrophoresis. The DNA concentration of each plasmid preparation was determined by spectrophotometry. *In vitro* transcription was performed using the MAXIscript Kit (Ambion, Cambridgeshire, UK) with T7 RNA

polymerase over linearized plasmid DNA, following the manufacturer's instructions.

2.6. Calibration of *in vitro*-transcribed RNA standards for viral RNA quantification

In vitro-transcribed RNA preparations were calibrated by comparison with recombinant plasmid curves quantified by spectrophotometry and containing WNV-L1, WNV-L2 and USUV target sequences, constructed as described above. The quantification was carried out as follows: first, standard cDNA curves were constructed by performing real-time PCRs specific for WNV L1, WNV L2 and USUV on serial tenfold dilutions (in triplicate) of the corresponding plasmid DNA templates. Regression curves were then obtained, representing the number of copies (calculated from the spectrophotometric quantitation of the plasmid DNA) vs. the cycle threshold value (C_t , cycle at which the fluorescence surpasses the background level). The regression equations obtained were: $y = -3.95x + 44.083$ ($r = 0.9996$) for WNV L1-plasmid; $y = -3.38x + 42.208$ ($r = 0.9996$) for WNV L2-plasmid; and $y = -3.37x + 41.297$ ($r = 0.9993$) for USUV-plasmid (where $y = C_t$ and $x =$ number of copies per reaction vial (4 µl); range assessed: 12–120,000). Finally, dilutions of each transcribed RNA preparation were analyzed (in triplicate) by each corresponding individually performed real-time RT-PCR, and the C_t values obtained were interpolated in the corresponding regression curve as described above. Mean concentration values estimated in this way for WNV-L1, WNV-L2 and USUV *in vitro*-transcribed RNA preparations were, respectively, 3.5×10^{10} , 1.25×10^9 and 6.8×10^8 equivalent RNA copies per µl.

For quantitative purposes, positive C_t values ($C_t \leq 40$) for each sample analyzed were interpolated in the corresponding regression curves obtained with standard synthetic RNAs derived from WNV-L1, WNV-L2 and USUV in order to calculate the number of equivalent RNA copies present in the sample.

2.7. Pan-flaviviral RT-PCR

To check for the integrity of each of the flaviviral RNAs used in this study, a gel-based heminested RT-PCR protocol was used, as previously described (Scaramozzino et al., 2001) and based on the primers described by Kuno (1998).

3. Results

3.1. Synthetic RNA detection and differentiation

The performance of the new multiplex assay was evaluated first by generating calibration curves using three *in vitro*-synthesized RNAs containing the WNV-L1, WNV-L2 and USUV target sequences. For this, the multiplex real-time RT-PCR assay was performed on dilutions of each synthetic RNA preparation (quantified as described in Section 2) in triplicate. As a result, three independent calibration curves were obtained, one for each *in vitro*-transcribed RNA (Fig. 1). These curves showed that: (1) the detection of each viral target sequence was specific, that is, fluorescence signals were obtained only from homologous and not from heterologous probes, and no cross-reaction between the different amplification reactions was observed; (2) the efficient differentiation of fluorescence signals from different probes, labelled with different fluorochromes, was possible; (3) the sensitivity of detection of each synthetic RNA, estimated as the smallest amount of RNA tested that reacted reliably in all (3/3) assayed replicates, were 14, 50 and 27 equivalent RNA copies/reaction tube (4 µl) of, respectively, WNV-L1-, WNV-L2- and USUV-derived synthetic RNAs; (4) linear regressions of the data showed that the three calibration curves were linear

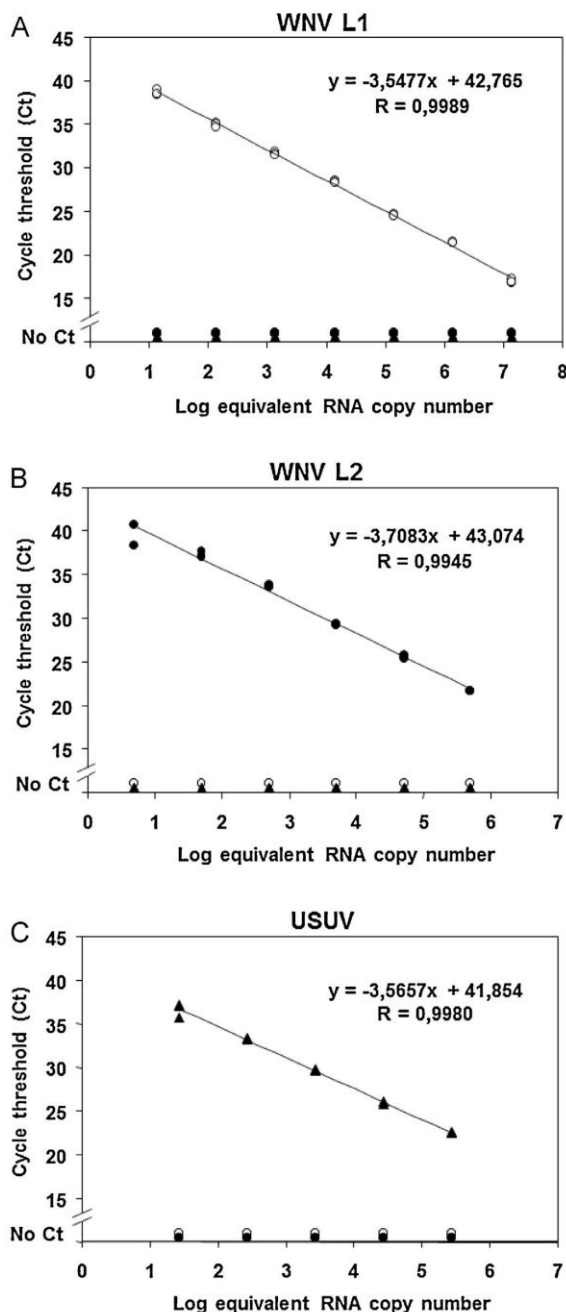


Fig. 1. Standard curves consisting of *in vitro*-transcribed RNAs derived from WNV lineage 1 (A), WNV lineage 2 (B) and USUV (C). Each plot represents the signal (cycle threshold, Ct) obtained when analyzing different amounts (expressed as \log_{10} of equivalent copy numbers) of standard RNA using the multiplex real-time RT-PCR for WNV-L1, WNV-L2 and USUV. The amplification of each type of RNA is measured in different fluorescence channels: FAM for WNV-L1 (open circles), VIC for WNV-L2 (closed circles) and Cy5 for USUV (solid triangles). Measurements were taken in triplicate. Each dot is the result of a single determination. The regression equations and correlation coefficients (R) are given for each plot.

over a broad range of dilutions (5–6 log units), with correlation coefficients >0.994 in all cases; (5) the slopes of the regression curves for the real-time RT-PCR amplifications of WNV-L1-, WNV-L2- and USUV-derived RNA sequences indicated efficiencies of 91%, 86% and 91%, respectively and (6) Ct values had excellent reproducibility given that the coefficient of variation of the triplicates ranged from 0.1% to 2.2%.

3.2. Viral RNA detection and differentiation

Serial tenfold dilutions were prepared with previously titrated virus seeds corresponding to the following viral strains: WNV-L1 NY99, WNV-L2 B956 and USUV SAAR 1776, containing, respectively 1.26×10^6 , 6.30×10^5 and 3.03×10^7 tissue culture infectious doses (TCID_{50})/ml. The dilutions were subjected to multiplex WNV-L1/WNV-L2/USUV real-time RT-PCR analysis in triplicate. Fig. 2 illustrates the amplification plots obtained for WNV-L1, WNV-L2 and USUV and shows that the multiplex assay detected dilutions up to $1:10^6$ for both WNV-L1 and USUV, and dilutions up to $1:10^5$ for WNV-L2. The detection limit of the multiplex real-time RT-PCR was $1.26 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ for WNV-L1, $6.3 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ for WNV-L2 and $30 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ for USUV. The linearity observed was maintained over $6 \log_{10}$ for WNV-L1 and USUV, and over $5 \log_{10}$ for WNV-L2. The correlation coefficients in these ranges were over 0.998 in all cases, with slopes corresponding to the following calculated efficiencies: 90.8% (WNV-L1), 92.3% (WNV-L2) and 99.1% (USUV). These results indicate that the novel real-time TaqMan RT-PCR is also highly efficient and sensitive in the detection and differentiation of viral preparations corresponding to WNV-L1, WNV-L2 and USUV prototype viral strains.

3.3. Sensitivity, specificity and performance with field and experimental samples

The new multiplex real-time RT-PCR method for WNV-L1/WNV-L2/USUV detection and differentiation was tested on viral RNA extracted from WNV lineage 1 (strains: E101, NY99 034EDV-crow, ArB310, 04.05, GE-1B/b, 15803 and Kunjin KJ359), WNV lineage 2 (B956, Austria/08) and from two USUV strains (SAAR-1776 and Vienna 2001). RNAs belonging to other flaviviruses differing from WNV and USUV, as well as to other viruses that could affect the same hosts and thus interfere in the diagnosis of WNV and USUV (Table 3), were analyzed in the same way in order to assess the specificity of the assay. The new real-time RT-PCR detected and identified correctly all the viruses tested corresponding to WNV-L1, WNV-L2 and USUV, but did not react with the RNA from the other viruses analyzed (Table 3).

To assess the performance of the multiplex real-time RT-PCR assay in different sample matrices, a panel of samples of blood, swabs (oropharyngeal and cloacal) and feathers from birds (red-legged partridge *Alectoris rufa*) infected experimentally with two different WNV strains (European and North African), along with tissue samples from mice inoculated with WNV strains belonging to L1 and L2 and employed in previous experiments in our laboratory (Sotelo et al., 2009), were analyzed. Negative samples of each of the sample matrices analyzed were included as controls for the assay (not shown). As shown in Table 4, the viruses in each of the corresponding experiments were correctly assigned in all samples analyzed, irrespective of type. Furthermore, in the case of field samples from wild birds naturally infected with WNV or USUV and from pooled mosquitoes infected with USUV (as assessed by other conventional diagnostic RT-PCR tools), the multiplex real-time RT-PCR assay herein described gave the correct result in all instances (Table 4).

Table 3

Specificity of the multiplex real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of WNV-L1/WNV-L2/USUV, using different viral strains (for equivalence of acronyms and full names of the viruses included in the analysis, see Section 2). The analysis was performed on 0.1 ml aliquots of virus-infected cell culture supernatants, either undiluted or diluted 1:10, subjected to RNA extraction, as described in Section 2.

Virus (strain)	Lineage	WNV-L1 FAM (Ct)	WNV-L2 VIC (Ct)	USUV Cy5 (Ct)	Log ₁₀ no. of copies
WNV (E101)	1a	20.59	No Ct	No Ct	6.25
WNV (NY99 034 EDV)	1a	19.55	No Ct	No Ct	6.54
WNV (ArB-310)	1a	23.63	No Ct	No Ct	5.39
WNV (04.05)	1a	19.42	No Ct	No Ct	6.58
WNV (GE1-B/b)	1a	16.46	No Ct	No Ct	7.41
WNV 15803	1a	17.34	No Ct	No Ct	7.17
WNV Kunjin KJ359	1b	20.29	No Ct	No Ct	6.34
WNV (B956)	2	No Ct	18.51	No Ct	6.62
WNV (Austria/2008)	2	No Ct	21.22	No Ct	5.89
WNV (Rabensburg 97-103)	3	No Ct	No Ct	No Ct	–
USUV (SAAR 1776)	–	No Ct	No Ct	23.95	5.02
USUV (Vienna/2001)	–	No Ct	No Ct	22.31	5.48
SLEV (FL52)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
MVEV (MV/1/1951)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
JEV (Nakayama)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
BAGV SPA-H/2010	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
DENV1 (Hawaii)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
TBEV (Neudorfl)	–	–	–	–	–
VEEV(UPA)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
VSV Indiana (Colorado/42)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
AIV H10N3 (A/Mallard/It/171283/06)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
EIV (A/Equine/2/Miami/1/63)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
NDV (Chicken/N.Ireland/Ulster 67)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–
AHSV-4 (Spain/89)	–	No Ct	No Ct	No Ct	–

4. Discussion

The recent spread of West Nile and Usutu viruses in Europe (Calistri et al., 2010; Sotelo et al., 2011a; Vazquez et al., 2011; Weissenböck et al., 2010) calls for new methods to be developed that can detect and differentiate efficiently these viruses and be used in both diagnostic and in surveillance programmes (except 'program' in computers). In particular, the ability to differentiate WNV lineages 1 and 2 would be of great use in cases of actual or potential circulation of these viruses in neighbouring or geographically overlapping areas, as could already be the case in NE Italy (Barzon et al., 2012; Savini et al., 2012), Hungary (Bakonyi et al., 2006) and Romania (Sirbu et al., 2011). This co-circulation will likely become even more common in the future as epidemics

caused by these viruses continue to spread. In addition, there is a growing list of European countries reporting the presence of Usutu virus since its initial detection in 2001 (Bakonyi et al., 2007) that includes Austria, Switzerland, Hungary, Italy, Spain and Germany (Becker et al., 2012; Vazquez et al., 2011), some of which are also affected by WNV L1 and/or L2. This fact makes the development of a diagnostic tool ensuring a fast, efficient, sensitive and specific detection and differentiation of these three flaviviruses even more urgent. Furthermore, a quantitative tool for evaluating the viral load in diagnostic specimens could be of utility in experimental studies of susceptible animals.

In this paper, we describe the development of a standardized multiplex fluorogenic real-time RT-PCR method, along with its validation using a variety of samples from both animals infected

Table 4

Performance of the multiplex real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of WNV-L1/WNV-L2/USUV in experimental and field samples.

Species	Virus ^a (strain)	Type of sample	WNV-L1 FAM (Ct)	WNV-L2 VIC (Ct)	USUV Cy5 (Ct)	Log ₁₀ no. of copies
Experimental samples						
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	WNV L1 (NY99)	Brain	16.11	No Ct	No Ct	7.51
		Heart	34.45	No Ct	No Ct	2.34
		Spleen	31.82	No Ct	No Ct	3.09
	WNV L2 (B956)	Brain	No Ct	22.33	No Ct	5.59
		Brain	No Ct	18.14	No Ct	6.72
		Brain	No Ct	17.02	No Ct	7.02
Red legged partridge (<i>Alectoris rufa</i>)	WNV L1 (GE-1-B/b)	Blood	28.86	No Ct	No Ct	3.92
		Feather	30.76	No Ct	No Ct	3.38
		Oral swab	34.56	No Ct	No Ct	2.31
	WNV L1 (04.05)	Cloacal swab	35.19	No Ct	No Ct	2.14
		Blood	25.44	No Ct	No Ct	4.88
		Feather	26.60	No Ct	No Ct	4.56
		Oral swab	34.37	No Ct	No Ct	2.37
		Cloacal swab	37.27	No Ct	No Ct	1.55
Field samples						
Golden eagle (<i>Aquila chrysaetos</i>)	WNV L1	Spleen	30.51	No Ct	No Ct	3.45
		Oral swab	32.40	No Ct	No Ct	2.92
Bonelli's eagle (<i>Hieraetus. fasciatus</i>)		Oral swab	33.30	No Ct	No Ct	2.67
Magpie (<i>Pica pica</i>)		Oral swab	33.79	No Ct	No Ct	2.53
Mosquito (<i>Culex pipiens</i>)	USUV	Mosquito pool	No Ct	No Ct	21.92	5.59
Starling (<i>Sturnus unicolor</i>)		Brain	No Ct	No Ct	28.23	3.82

^a This column indicates the virus/strain used in each experimental inoculation (above) or the virus detected by routine diagnosis in the field samples examined (below).

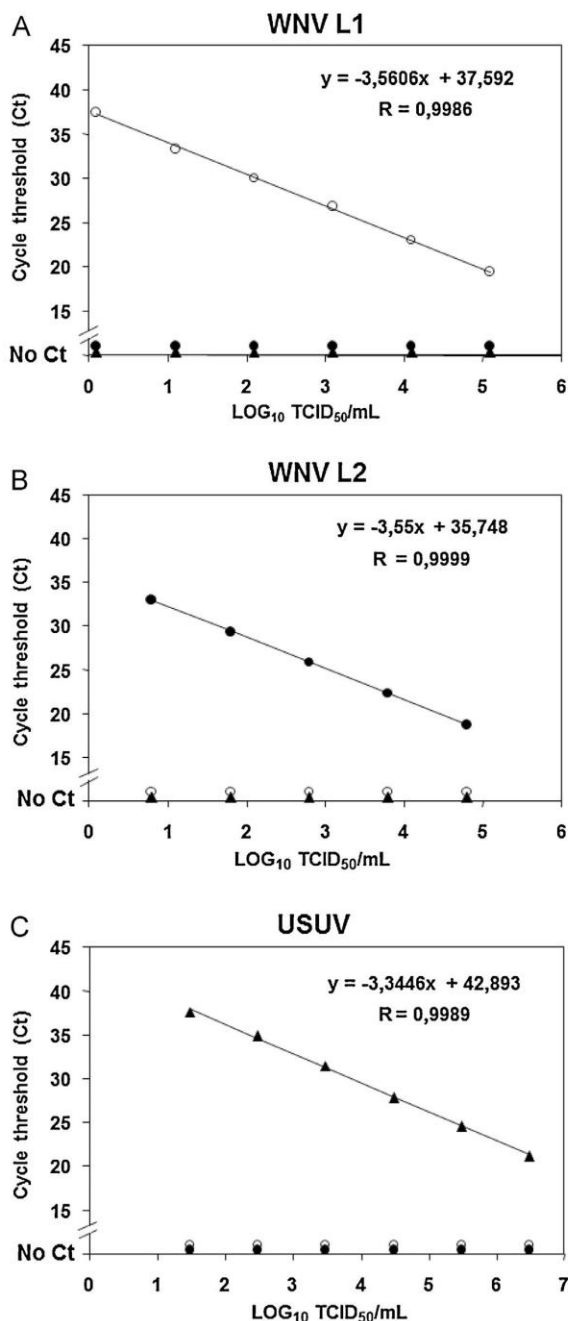


Fig. 2. Detection of virus dilutions (expressed as Log_{10} of 50% tissue-culture infectious dose, TCID_{50} , per ml) with the multiplex WNV-L1/WNV-L2/USUV real-time RT-PCR. Tenfold dilutions of WNV-L1 (A), WNV-L2 (B) and USUV (C) were assayed in triplicate. The amplification of each type of virus is measured in different fluorescence channels: FAM for WNV-L1 (open circles), VIC for WNV-L2 (solid circles), and Cy5 for USUV (solid triangles). Each dot represents the mean of a triple determination. Regression equations and correlation coefficients (R) are indicated for each plot.

experimentally and from field samples. This new method is not only highly sensitive when detecting WNV lineages 1 and 2, and USUV simultaneously in the same test-tube (a feature that makes it more cost-effective) but also permits these three viruses to be identified and quantified correctly. To our knowledge, no other method that detects and differentiates three flaviviruses simultaneously is currently available. Moreover, the method presented here is specific and does not react with other phylogenetically related flaviviruses such as TBEV and BAGV, both of which are already present in Europe. BAGV is of particular concern since it circulates in wild birds in areas already affected by WNV (Aguero et al., 2011). A BAGV-specific detection method has been made available recently (Buitrago et al., 2012) and a combination of these two methods would be of great value for the monitoring of viruses in affected areas. The validation also showed that this new multiplex method does not detect viruses that, although unrelated phylogenetically, could be confused clinically or occur in the same samples as those that are habitually examined for the presence of WNV or USUV in diagnosis and surveillance programmes (except 'program' in computers).

Like most other real-time fluorogenic RT-PCR methods in one-step formats, this newly described method is fast and only takes about 2 h 15 min to complete. The turn-around time from the arrival of samples in the laboratory to the outcome is quick, thereby allowing results – including sample processing, extraction and analysis – to be obtained within a single working day. It is suitable for screening large numbers of samples using high-throughput formats as described elsewhere for other similar tests (Jimenez-Clavero et al., 2006b) and is therefore optimal for routine analysis of field, clinical and experimental samples. For these reasons, this new method represents an efficient tool for obtaining rapid results and thus enables quick and timely decisions to be taken during an outbreak and the progress of an epidemic to be tracked. However, it is not intended to substitute other methods of analysis such as serology, virus isolation or fine virus-typing by molecular sequencing techniques that are still necessary.

In order to validate the test for different sample matrices, a wide range of sample types were subjected to analysis. These included homogenates of different tissues and organs, blood, feathers and mosquitoes, that is, the types of samples that are most likely to be used for diagnostic and surveillance purposes. Although this method has yet to be tested using human samples, it is expected to perform equally well with blood and cerebrospinal fluids, the samples that are usually chosen for the diagnosis of these flaviviral infections in humans. In particular, this test could also be useful for monitoring blood supplies as potential sources of transmission.

The quantitative performance of this new method shows that it can be used to estimate viral loads in blood and/or other organs or samples. Albeit not mandatory for tests in diagnostic or surveillance studies, this ability could be used to monitor the clinical course of an infection by these viruses. The method performed satisfactorily on both qualitative and quantitative basis during our tests: used quantitatively, it helped to assess viral loads in a number of samples from animals (birds and mice) infected experimentally and allowed comparisons to be made, a feature that may eventually be of use in studies of pathogenesis and in the evaluation of target tissues/organs in different hosts, such as in a recently published work (Sotelo et al., 2009, 2011c) and in on-going research by our group.

In conclusion, the multiplex real-time RT-PCR described here provides a novel tool for the diagnostic and epidemiological surveillance of three flaviviruses, WNV lineages 1 and 2 and USUV, all three currently present in Europe. This feature allows for the rapid detection and differentiation of these three viruses in areas in which the co-circulation of more than one of these viruses is suspected.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Ana Robles and Covadonga Pérez for their excellent technical help; Ana Moreno and Paolo Cordioli for providing WNV strain 15804 and the samples of the USUV-infected mosquitoes and starling, and the WNV-infected magpie; Norbert Nowotny for providing the Austria/2008 isolate of WNV; Antonio Tenorio for providing RNA from several flavivirus species, and Mehdi El-Harrak for providing WNV strain 04.05. This work was funded by INIA Grant FAU 2008-00002-00-00, FIS Grant 2007-1309, and EU Grant HEALTH 2010.2.3.3-3 Project 261391 EuroWestNile. Elena Sotelo was a fellow from INIA.

References

Aguero, M., Fernandez-Pinero, J., Buitrago, D., Sanchez, A., Elizalde, M., San Miguel, E., Villalba, R., Llorente, F., Jimenez-Clavero, M.A., 2011. Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1498–1501.

Bakonyi, T., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Csorgo, T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Meister, T., Weissenböck, H., Nowotny, N., 2007. Emergence of Usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3870–3874.

Bakonyi, T., Hubalek, Z., Rudolf, I., Nowotny, N., 2005. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 225–231.

Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdelyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., Nowotny, N., 2006. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 618–623.

Barzon, L., Franchin, E., Squarzon, L., Lavezzo, E., Toppo, S., Martello, T., Bressan, S., Pagni, S., Cattai, M., Piazza, A., Pacenti, M., Cusinato, R., Palu, G., 2009. Genome sequence analysis of the first human West Nile virus isolated in Italy in 2009. *Euro Surveill.* 14, 44.

Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Squarzon, L., Lavezzo, E., Toppo, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R., Palu, G., 2012. Novel West Nile virus lineage 1a full genome sequences from human cases of infection in north-eastern Italy, 2012. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E541–E544.

Becker, N., Jost, H., Ziegler, U., Eiden, M., Hoper, D., Emmerich, P., Fichtel-Calvet, E., Ehichioya, D.U., Czajka, C., Gabriel, M., Hoffmann, B., Beer, M., Tenner-Racz, K., Racz, P., Gunther, S., Wink, M., Bosch, S., Konrad, A., Pfeffer, M., Groschup, M.H., Schmidt-Chanasit, J., 2012. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS ONE* 7, e32604.

Bondre, V.P., Jodi, R.S., Mishra, A.C., Yergolkar, P.N., Arankalle, V.A., 2007. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J. Gen. Virol.* 88, 875–884.

Buitrago, D., Rocha, A., Tena-Tomas, C., Vigo, M., Aguero, M., Jimenez-Clavero, M.A., 2012. Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for the specific detection of Bagaza virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 959–963.

Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G., Lelli, R., 2010. Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol. J.* 4, 29–37.

Cavirini, F., Della Pepa, M.E., Gaibani, P., Pierro, A.M., Rossini, G., Landini, M.P., Sambri, V., 2011. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.* 50, 221–223.

Cavirini, F., Gaibani, P., Longo, G., Pierro, A.M., Rossini, G., Bonilauri, P., Gerundi, G.E., Di Benedetto, F., Pasetto, A., Girardis, M., Dottori, M., Landini, M.P., Sambri, V., 2009. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy. *Euro Surveill.* 14, 50.

De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M., Sanders, N.N., 2012. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* 43, 16.

Gould, E.A., de Lamballerie, X., Zanotto, P.M., Holmes, E.C., 2003. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus flavivirus. *Adv. Virus Res.* 59, 277–314.

Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S.M., Mertens, P., Oura, C.A., van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., Alexander, D.J., King, D.P., 2009. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139, 1–23.

Jimenez-Clavero, M.A., Aguero, M., Rojo, G., Gomez-Tejedor, C., 2006a. A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 459–462.

Jimenez-Clavero, M.A., Aguero, M., San Miguel, E., Mayoral, T., Lopez, M.C., Ruano, M.J., Romero, E., Monaco, F., Polci, A., Savini, G., Gomez-Tejedor, C., 2006b. High throughput detection of bluetongue virus by a new real-time fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction: application on clinical samples from current Mediterranean outbreaks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 7–17.

Jimenez-Clavero, M.A., Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Llorente, F., Blanco, J.M., Rodriguez-Ramos, J., Perez-Ramirez, E., Hofle, U., 2008. West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1489–1491.

Jost, H., Bialonski, A., Maus, D., Sambri, V., Eiden, M., Groschup, M.H., Gunther, S., Becker, N., Schmidt-Chanasit, J., 2011. Isolation of Usutu virus in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 551–553.

Kramer, L.D., Styer, L.M., Ebel, G.D., 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 61–81.

Kuno, G., 1998. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J. Virol. Methods* 72, 27–41.

Lancioti, R.S., Ebel, G.D., Deubel, V., Kerst, A.J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W.E., Crabtree, M.B., Kramer, L.D., Roehrig, J.T., 2002. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the middle East. *Virology* 298, 96–105.

Lancioti, R.S., Kerst, A.J., Nasci, R.S., Godsey, M.S., Mitchell, C.J., Savage, H.M., Komar, N., Panella, N.A., Allen, B.C., Volpe, K.E., Davis, B.S., Roehrig, J.T., 2000. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4066–4071.

Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., Nitsche, A., Pauli, G., 2007. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J. Virol. Methods* 146, 355–358.

Lvov, D.K., Butenko, A.M., Gromashevsky, V.L., Kovtunov, A.I., Prilipov, A.G., Kinney, R., Aristova, V.A., Dzharkegov, A.F., Samokhvalov, E.I., Savage, H.M., Shchelkanov, M.Y., Galkina, I.V., Deryabin, P.G., Gubler, D.J., Kulikova, L.N., Alkhovsky, S.K., Moskvina, T.M., Zlobina, L.V., Sadykova, G.K., Shatalov, A.G., Lvov, D.N., Usachev, V.E., Voronina, A.G., 2004. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging–reemerging situations. *Arch. Virol. Suppl.* 18, 85–96.

Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulos, K., Vázquez, A., Tenorio, A., Nowotny, N., 2011. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 920–922.

Pecorari, M., Longo, G., Gennari, W., Grottola, A., Sabbatini, A., Tagliacucchi, S., Savini, G., Monaco, F., Simone, M., Lelli, R., Rumpianesi, F., 2009. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy. *Euro Surveill.* 14, 50.

Platonov, A.E., Fedorova, M.V., Karan, L.S., Shopenskaya, T.A., Platonova, O.V., Zhuravlev, V.I., 2008. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol. Res.* 103 (Suppl. 1), S45–S53.

Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating 50% endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.

Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., Di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., Piscicella, M., Terregino, C., Marangon, S., Capua, I., Lelli, R., 2012. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* 158, 267–273.

Savini, G., Monaco, F., Terregino, C., Di Gennaro, A., Bano, L., Pinoni, C., De Nardi, R., Bonilauri, P., Pecorari, M., Di Galleonardo, L., Bonfanti, L., Polci, A., Calistri, P., Lelli, R., 2011. Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? *Vet. Microbiol.* 151, 264–274.

Scaramozzino, N., Crance, J.M., Jouan, A., DeBriel, D.A., Stoll, F., Garin, D., 2001. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1922–1927.

Sirbu, A., Celanu, C.S., Panculescu-Gatej, R.I., Vázquez, A., Tenorio, A., Reboreanu, R., Niedrig, M., Nicolescu, G., Pistol, A., 2011. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July–October, 2010. *Euro Surveill.* 16, 2.

Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Jimenez-Clavero, M.A., 2011a. La fiebre/encefalitis por virus West Nile: reemergencia en Europa y situación en España. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 30, 75–83.

Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Llorente, F., Vázquez, A., Moreno, A., Aguero, M., Cordioli, P., Tenorio, A., Jimenez-Clavero, M.A., 2011b. Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus strains (1996–2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions. *J. Gen. Virol.* 92, 2512–2522.

Sotelo, E., Gutierrez-Guzman, A.V., Del Amo, J., Llorente, F., El-Harrak, M., Perez-Ramirez, E., Blanco, J.M., Hofle, U., Jimenez-Clavero, M.A., 2011c. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Vet. Res.* 42, 11.

Vázquez, A., Jimenez-Clavero, M., Franco, L., Donoso-Mantke, O., Sambri, V., Niedrig, M., Zeller, H., Tenorio, A., 2011. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill.* 16, 31.

Vázquez, A., Sanchez-Seco, M.P., Ruiz, S., Molero, F., Hernandez, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C.G., Tenorio, A., 2010. Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 549–552.

Weissenböck, H., Hubalek, Z., Bakonyi, T., Nowotny, N., 2010. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet. Microbiol.* 140, 271–280.

Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., Nowotny, N., 2002. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 652–656.

Zaayman, D., Human, S., Venter, M., 2009. A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real-time PCR. *J. Virol. Methods* 157, 155–160.

Capítulo III

***Experimental infection of house sparrows
(Passer domesticus) with West Nile virus isolates of
Euro-Mediterranean and North American origins.***

Infección experimental del gorrión común (*Passer domesticus*) con aislados del virus West Nile de origen Euro-mediterráneo y norteamericano

Resumen

El virus West Nile (WNV) es un patógeno zoonótico transmitido por mosquitos en un ciclo que involucra a aves silvestres como reservorios. Este virus ha emergido recientemente en Norteamérica y re-emergido en Europa. Los brotes del WNV en Norteamérica vienen acompañados normalmente por una alta mortalidad en aves silvestres, un hecho que es poco común en Europa. La razón de esta diferencia no se conoce, pero tanto la virulencia intrínseca de las cepas circulantes en cada continente como la susceptibilidad a la enfermedad de las aves Paleárticas frente a las Neárticas pueden desempeñar un papel en estas diferencias. Para evaluar esta cuestión, se llevaron a cabo inoculaciones experimentales con cuatro cepas pertenecientes al linaje 1 de WNV, tres cepas del sur de Europa (Italy/2008, Italy/2009 y Spain/2007) y una de Norteamérica (NY99) en el gorrión común (*Passer domesticus*), un ave passeriforme común en ambos continentes. No se hallaron diferencias significativas en la mortalidad, entre 0% y 25%, para las distintas cepas de WNV. La viremia duró entre 5 y 6 días post-inoculación en todos los casos; los individuos inoculados con NY99 tuvieron significativamente mayores títulos virales en sangre que con el resto de cepas. En consecuencia, a pesar de que las cepas Euro-mediterráneas son patogénicas para el gorrión común, tuvieron una menor capacidad para replicarse y ser transmitidas por este hospedador en comparación con la cepa NY99. Si fuera aplicable para otras especies de aves silvestres, esta capacidad relativamente reducida de trasmisión de las cepas Euro-mediterráneas podría explicar la menor incidencia de la enfermedad en aves silvestres en el territorio Euro-mediterráneo.

RESEARCH

Open Access

Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins

Javier Del Amo¹, Francisco Llorente¹, Jordi Figuerola², Ramón C Soriguer², Ana M Moreno³, Paolo Cordioli³, Herbert Weissenböck⁴ and Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{1*}

Abstract

West Nile virus (WNV) is a zoonotic arboviral pathogen transmitted by mosquitoes in a cycle involving wild birds as reservoir hosts. The virus has recently emerged in North America and re-emerged in Europe. North American WNV outbreaks are often accompanied by high mortality in wild birds, a feature that is uncommon in Europe. The reason for this difference is unknown, but the intrinsic virulence of the viruses circulating in each continent and/or the susceptibility to the disease of Palearctic as opposed to Nearctic wild bird species could play a role. To assess this question, experimental inoculations with four lineage 1 WNV strains, three from southern Europe (Italy/2008, Italy/2009 and Spain/2007) and one from North America (NY99) were performed on house sparrows (*Passer domesticus*), a wild passerine common in both continents. Non-significant differences which ranged from 0% to 25% were observed in mortality for the different WNV strains. Viremias lasted from 1 to 5–6 days post-inoculation (dpi) in all cases; individuals inoculated with NY99 had significantly higher titres than those inoculated with any of the Euro-Mediterranean strains. Remarkably, host competence was found to be higher for NY99 than for the other strains. Consequently, albeit being pathogenic for house sparrows, some Euro-Mediterranean strains had reduced capacity for replication in -and transmission from- this host, as compared to the NY99 strain. If applicable also to other wild bird host species, this relatively reduced transmission capacity of the Euro-Mediterranean strains could explain the lower incidence of this disease in wild birds in the Euro-Mediterranean area.

Introduction

West Nile virus (WNV, *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus) is an arthropod-borne pathogen of humans, horses and some birds [1]. In recent years WNV has expanded its geographical range dramatically and is now considered to be one of the most widespread arboviruses in the world [2–4]. In North America, since its introduction in 1999, WNV has provoked thousands of cases in humans and animals, and has caused extensive mortality in wild birds [5]. By contrast, in Europe, where the disease is re-emerging, WNV only causes sporadic clinical cases and self-limited outbreaks, with no (or only very limited) wild bird mortality [4,5]. The reason for these observed differences in wild bird mortality is unknown but could be

related either to the relative intrinsic virulence of the WNV strains circulating in each continent and/or to a different susceptibility to WNV infection in Palearctic as opposed to Nearctic wild bird species, given that the former have co-evolved with this pathogen while the latter are naïve in this regard.

A useful approach for investigating this issue is the performance of experimental infections in avian hosts with strains of different origins [6]. The virulence of the North American WNV prototype strain (NY99) in different avian species has been assessed experimentally in a number of studies [7–13] from which it is apparent that this strain is highly pathogenic for certain species of birds, notably – but not exclusively – Nearctic corvids [7]. The house sparrow (*Passer domesticus*) (HoSp hereafter), an abundant and ubiquitous passerine, has also been shown to be susceptible to WNV disease after experimental inoculation with the NY99 strain, with mortality rates

* Correspondence: majimenez@inia.es

¹Centro de Investigación en Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), Ctra Algete-El Casar s/n, Valdeolmos, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Del Amo et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ranging from 10% to 50% [7,14,15]. As a widespread wild bird species, HoSp could potentially represent a useful model for experimental studies on the comparative virulence of WNV strains with different geographical and/or phylogenetic origins. A recent study compared the virulence of NY99 in this host species with two other WNV strains, namely KN-3829 and Kunjin-6453 [16]. The former was isolated in Kenya in 1998 and belongs to the Western-Mediterranean-Eastern-European-Kenyan phylogenetic cluster within lineage 1a [17], while the latter was isolated in Australia in 1991 and belongs to lineage 1b. In the aforementioned study NY99 and KN-3829 induced similar mortalities, while Kunjin-6453 showed no virulence in host birds. The fact that an Old World WNV strain is as virulent as the North American prototype strain for HoSp is intriguing since it implies that the perceived mortalities in HoSp should also have occurred in the Old World WNV outbreaks when, in fact, no such observations have been reported.

Phylogenetically, KN-3829 is closely related to the majority of WNV isolates that have been circulating since 1996 in the western Mediterranean and Eastern Europe; nevertheless, despite this, 6–13 amino-acid residue substitutions still remain in the whole polyprotein sequence (3433 residues) between the Kenyan and the Euro-Mediterranean strains. Small changes in the viral RNA sequence may lead to relevant virulence shifts [18,19] and so it is possible that the observed virulence of the Kenyan strain for HoSp might not be applicable to other WNV strains belonging to the same phylogenetic cluster. In order to assess the virulence for HoSp of other WNV strains belonging to the Euro-Mediterranean cluster, wild HoSp captured in Spain were inoculated with three Euro-Mediterranean lineage 1 WNV strains, Spain/2007, Italy/2008 and Italy/2009, and the course of the infection was compared with that caused by inoculation with the NY99 strain.

Materials and methods

Viruses and virus preparations

The four West Nile virus strains used in this work were as follows: NY99-crow-V76/1, a North American WNV strain, isolated from a diseased crow during the WNV outbreak in New York in 1999 (GenBank accession n° FJ151394); GE-1b/B, isolated from a golden eagle that died as a consequence of WNV infection in Toledo, Spain in 2007, (GenBank accession n° FJ766331 [20]; hereafter “Spain/2007”); Italy 15803/08, isolated from a magpie hunted during a pest-control programme in Ravenna, Italy in 2008 (GenBank accession n°: FJ483549; hereafter “Italy/2008”); and Italy/2009, isolated from a yellow-legged gull found moribund in Ravenna, Italy, in 2009, along with several other WNV-infected individuals of the same species, that died afterwards in a wildlife rehabilitation

centre (GenBank accession n°: JF719067). The NY99 strain was obtained through the National Veterinary Service Laboratories, USDA, lot n° 034EDV0601, while the other WNV strains were those used in our previous works [17,20,21]. All the above viruses were propagated and titrated by plaque assays in Vero cells (ATCC CCL-81) and were completely sequenced prior to inoculation in order to ascertain that the viruses inoculated had nucleotide sequences identical to those available in GenBank.

Birds and animal care

Free-living HoSp were captured using mist nets and banded in the province of Sevilla, Spain. After habituation in captivity for two months in Sevilla, they were transported to the high-level biocontainment facility at CISA (Valdeolmos, Spain), where they were bled to determine their pre-existing immunity to WNV and housed in individual cages installed in the BSL-3 facilities. HoSp were randomly distributed in groups of 8 individuals, composed (whenever possible) of 50% males and 50% females. Mixed bird-seed and water were supplied *ad libitum*. All the animal care, handling and experimental procedures performed in this work were supervised and approved by the National Committee for Ethics and Welfare in Animal Experimentation in Spain according to European legislation (Council Directive 86/609/EEC).

Experimental inoculations

After seven days of acclimatization in the BSL-3 room, groups of 8 HoSp were inoculated subcutaneously in the neck with 0.1 mL of viral suspension. Viruses were previously diluted in DMEM supplemented with antibiotics and glutamine, to obtain approximately 10.000 plaque-forming units (pfu)/bird of the assigned WNV strain. Each group was inoculated with a different WNV strain (see “Viruses and virus preparations” section). At the same time, a control group ($n = 8$), kept in separate cages in the same room as the infected ones, was sham-inoculated with an equivalent volume of diluent and manipulated in the same way as the virus-inoculated groups.

Clinical follow-up and collection of samples

The experimental procedure was based on Sotelo et al. [22], albeit with some modifications. All birds were monitored daily for clinical signs of illness. To follow the course of the viremia and viral load, 0.1 mL blood samples (obtained from the jugular vein) were collected at 1, 3, 5 and 7 days post-inoculation (dpi) from half of the birds (four in each group) and at 2, 4, 6 and 8 dpi from the other half, that is, from alternating individuals in order to minimize animal manipulation, reduce unnecessary stress and limit the risk of provoking anaemia due to repeated bleeding. Similarly, oropharyngeal and cloacal swab samples were collected from all birds one

day before inoculation, at 1, 5, 7 and 11 dpi from half of the birds, and at 2, 4, 8 and 12 dpi from the other half. Blood samples were collected in sterile polypropylene tubes filled with 0.9 mL BA-1 diluent (Hanks M-199 salts, 0.05 M Tris, pH 7.6, 1% bovine serum albumin, 0.35 g/L of sodium bicarbonate, 100 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin, 1 µg/mL of amphotericin B), mixed and stored at -70 °C until analysis. Swab samples were placed in sterile polypropylene tubes containing 1 mL PBS and immediately stored at -70 °C until analysis. Birds that succumbed to the infection were necropsied within 18 h following death. Single-use scalpels and forceps were employed during necropsy to avoid the cross-contamination of tissues. Tissue samples from the brain, kidney, heart, liver and spleen were obtained from birds succumbing to the infection, or euthanized at the end of the experiment (21 dpi). One aliquot of sample was homogenized in 0.9 mL PBS as described [22], while a second was fixed with 4% buffered formaldehyde solution and processed for immunohistochemical analysis as described [23] with the only exception that the primary antibody was from a different source (P. Emrich, Bernhard Nocht Institute, Germany). In order to obtain serum for antibody detection techniques (see below), additional blood samples (0.1–0.2 mL/individual) were taken prior to inoculation and at 14 dpi. They were collected in dry tubes and allowed to clot at 37 °C for 1 h, followed by incubation at 4 °C overnight.

Viremia and viral load assays

Viremia was measured using a standard plaque-formation assay in Vero cells as previously described [24]. The viral load in blood and tissue samples was measured essentially as previously described [22] using a semi-quantitative real-time RT-PCR method for the detection of the lineage 1 WNV genome [25]. Virus shedding was assessed in oropharyngeal and cloacal swabs using the same procedures. A Ct = 40.0 was set as cut-off for the real-time RT-PCR used.

Antibody detection assays

Serum antibodies to WNV were detected by a commercially available epitope-blocking ELISA (Ingezym West Nile Compac, INGENASA, Madrid, Spain) suitable for the detection of antibodies to WNV in the serum of wild birds [26].

Calculation of host competence index (Ci) values

The calculation of competence index values for inoculated HoSp was based on the formula described elsewhere [27], considering infectious viremia values as all those above $> 10^{5.0}$ pfu/mL for *Culex pipiens* mosquitoes as has been previously described [28].

Statistical analysis

The viremia and blood genome load of the different inoculated groups were compared using a mixed-effects ANOVA. Individual identity was included as a random factor, while day, virus strain and the interaction between day and virus strains were included as independent factors.

Results

Pathogenicity and clinical signs

Table 1 provides a comparison of the deduced amino-acid sequence from each of the four WNV strains used in this work and highlights where amino-acid substitutions were found in the sequences. In the group inoculated with the NY99 strain two individuals succumbed to the infection at 4 dpi. Euro-Mediterranean strains caused either the same (Spain/2007 strain: 2/8), lower (Italy/2009: 1/8) or no mortality (Italy/2008: 0/8) (Figure 1). The deaths caused by the Euro-Mediterranean strains occurred 2–3 days (at 6–7 dpi) later than those caused by NY99 (4 dpi) (Figure 1). In addition, two sparrows in the NY99-inoculated group showed clinical signs, beginning at 4 dpi, that were characterized by abnormal posture, apathy, prostration, unresponsiveness and behavioural changes such as no avoidance of capture. These signs remained until the end of the monitoring period (14 dpi). No clinical signs were observed in any of the HoSp surviving the inoculation of the Euro-Mediterranean strains. All control sparrows survived and none were infected (not shown).

Viremia and host competence analysis

All inoculated HoSp (except one, inoculated with Italy/2008 strain, which remained negative throughout the whole experiment) developed detectable viremias that lasted up to 5–6 dpi (Figure 2). The NY99-inoculated group showed a significantly higher mean peak viremia ($p < 0.05$) than those HoSp inoculated with the Euro-Mediterranean strains. Viral genome load data essentially corroborated the results from the viremia analyses (Figure 2). Viremias tended to be higher in the HoSp succumbing to the infection than in the survivors. This was particularly true for the two HoSp succumbing to NY99 inoculation, which reached 9.0 and 9.1 log₁₀ pfu per mL of plasma respectively, while those surviving NY99 infection developed a mean peak viremia of 6.9 log₁₀ pfu per mL of plasma ($n = 6$).

Based on viremia levels, it is possible to estimate the reservoir competence of a species with regards to a given viral strain [7]. A threshold of 5 log₁₀ pfu/mL of blood has been calculated as the minimum amount of WNV needed to infect *Culex pipiens* mosquitoes [28]. On average, all groups of HoSp inoculated with the different WNV strains exceeded this threshold, which indicates that the HoSp is a competent host for the transmission of all the strains

Table 1 Amino-acid composition of the four tested WNV strains

Viral protein	Amino-acid position	Consensus	NY99	Spain/2007	Italy/2009	Italy/2008
C	34	M	-	V	-	-
	51	A	-	T	-	-
E	88	P	-	S	-	-
	126	T	I	-	-	-
	159	I	V	-	-	-
	35	Y	-	H	-	-
NS1	70	S	A	-	-	-
	208	D	-	H	-	-
	284	T	-	-	M	-
	289	E	-	G	-	-
NS2A	85	I	-	-	V	V
	105	I	-	-	-	T
NS2B	103	A	V	-	-	-
NS3	249	P	-	-	T	-
	356	I	T	-	-	-
NS4A	85	I	A	V	-	-
	100	P	-	-	S	S
NS4B	115	A	-	T	-	-
	249	D	E	-	-	-
	53	H	-	-	-	Y
NS5	258	V	-	-	A	A
	422	R	-	-	K	K
	426	E	-	A	-	-
	436	M	-	I	-	-

The amino-acid sequence of the four WNV strains is compared with the WNV consensus sequence. From the left, the first and second columns display viral protein and amino-acid position, respectively, followed by the column displaying the consensus sequence and those corresponding to each WNV strain. The amino-acid residue occupying each position is indicated with the single letter amino-acid code.

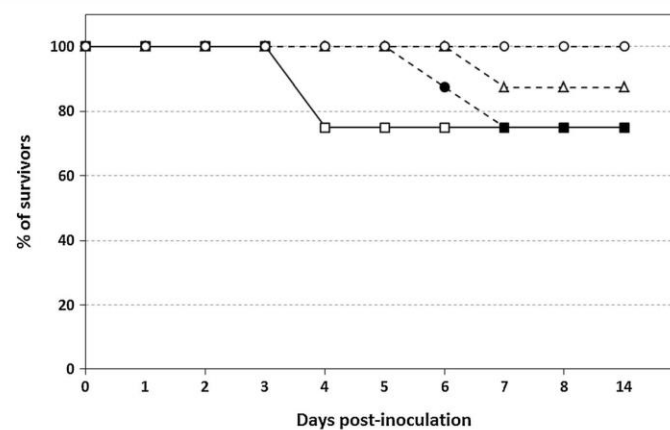
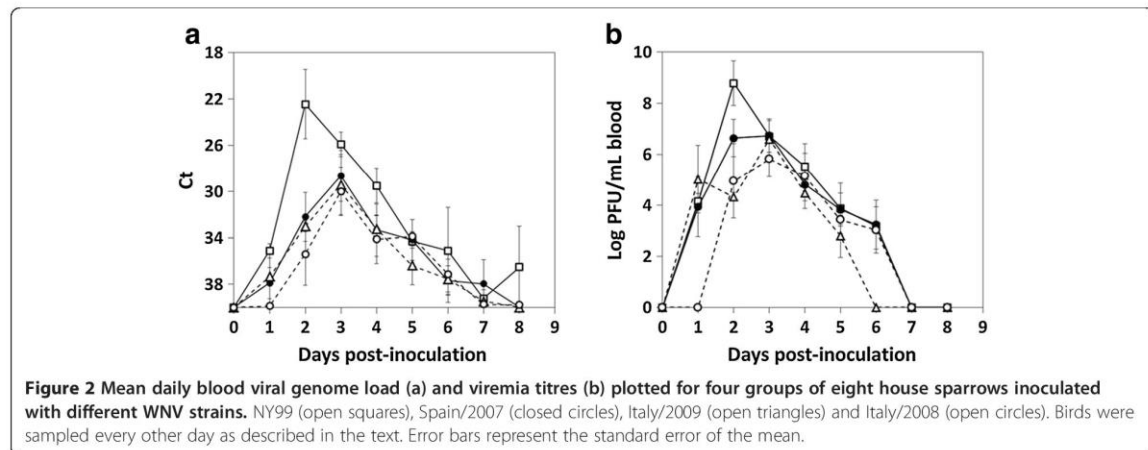


Figure 1 Survival of house sparrows infected with different WNV strains. NY99 (open squares), Spain/2007 (closed circles), Italy/2009 (open triangles) and Italy/2008 (open circles). The percentage of house sparrows surviving in each group is plotted against days post-inoculation. No mortality was found in the control group.



analyzed in this study. However, differences were observed in this respect in the competence indexes calculated for each strain (Table 2). In particular, the HoSp is a better competent host for the transmission of NY99 ($C_i = 1.15$) than for the Euro-Mediterranean strains that were examined ($C_i = 0.17-0.47$).

Virus distribution in organs

In all inoculated HoSp developing viremia, the infection was systemic as the virus was found in a wide range of organs upon necropsy. In general, viral loads were the highest in the spleen and then in the kidney. Liver had intermediate viral loads, while the heart and brain, the lowest values (Figure 3). Interestingly, certain differences were observed between WNV strains: in all cases HoSp inoculated with NY99 developed higher viral load in organs than those inoculated with the Euro-Mediterranean strains (Figure 3) in both dead and surviving birds (Table 3). The observed viral loads in organs from the HoSp succumbing to the infection were remarkably higher than in the organs from the surviving birds (Table 3); nevertheless, these comparisons could be misleading since survivors

must have cleared most of the virus by the time they were necropsied at the end of the experiment (14 dpi). Immunohistopathological analysis of brain tissues showed WNV-specific staining only in NY99-infected HoSp (data not shown).

Oral and cloacal virus shedding

Virus was shed both through oropharyngeal and cloacal routes, starting from 2 dpi and lasting to 7 dpi in most cases, although some individuals still shed virus at up to 12 dpi (Figure 4). A higher proportion of individuals infected by the NY99 strain shed virus by these routes. Virus was more abundant and more consistently detected in oropharyngeal than in cloacal swabs, particularly between 2 and 7 dpi. At 5 dpi most cloacal and oropharyngeal swabs were positive. The period of oropharyngeal virus shedding for HoSp inoculated with NY99 started at 2 dpi and ceased at 5 dpi, slightly earlier than for the HoSp inoculated with the different Euro-Mediterranean strains.

Serology

All HoSp surviving the inoculation (except the above-mentioned bird inoculated with Italy/2008 strain, which did not become viremic) developed antibodies to WNV detectable by ELISA at 14 dpi (data not shown).

Discussion

The house sparrow is an abundant and widely distributed passerine species, which shares its habitat with humans. Although present in North America by 1850, it is in fact native to regions of Europe, Africa and Asia [29] where WNV circulates. HoSp are not only susceptible to WNV infection, but are also competent hosts for WNV transmission as has been shown in previous work [7,14,15]. However, most of these studies were performed with the North American-type strain NY99 and works of this nature using WNV strains from other continents are still

Table 2 Host competence index calculated for each group of house sparrows

Strain	Susceptibility (s)	Infectiousness (i)	Mean duration (d)	C_i
NY99	1.00	0.37	3.11	1.15
Spain/2007	1.00	0.19	2.49	0.47
Italy/2009	1.00	0.15	1.43	0.21
Italy/2008	0.88	0.09	2.09	0.17

The competence index (C_i) reflects the relative number of infectious mosquitoes that could be derived from feeding on a particular bird species (in this case, house sparrows) infected by a given virus strain (in this case, four WNV strains: NY99, Spain/2007; Italy/2008 and Italy/2009). C_i is determined as the product of susceptibility (proportion of exposed birds that become infected), infectiousness (proportion of vectors that become infected per day) and transmissible viremia duration (number of days a bird maintains an infectious viremia).

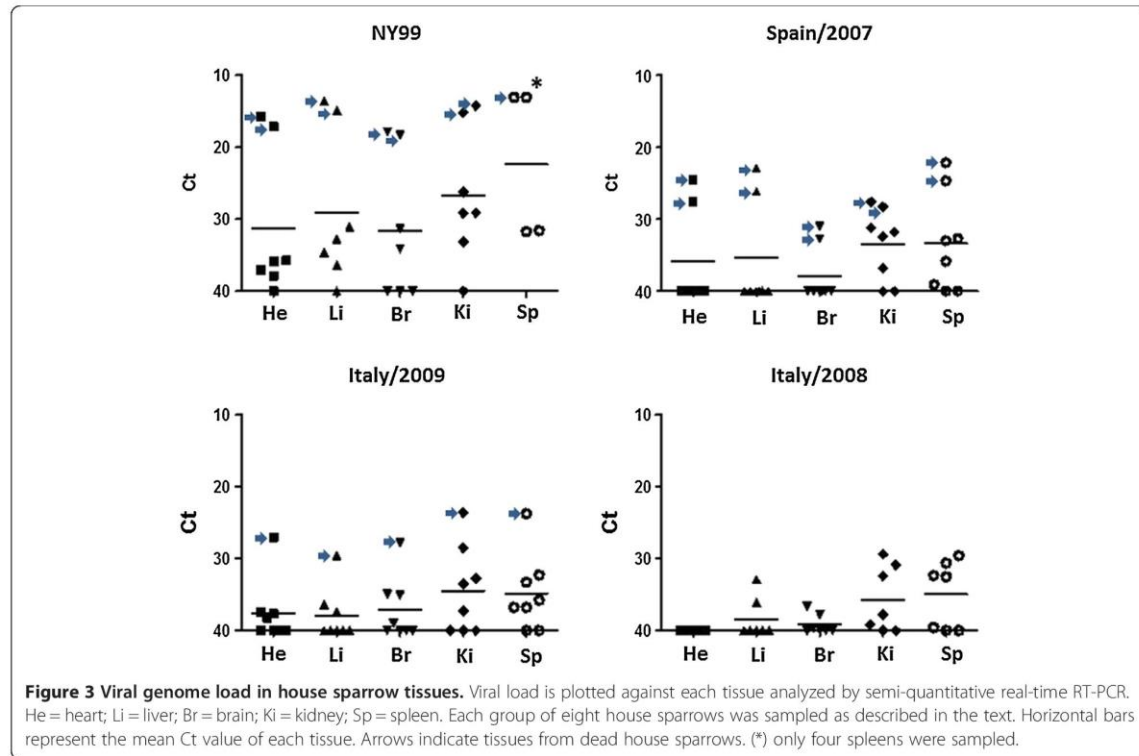
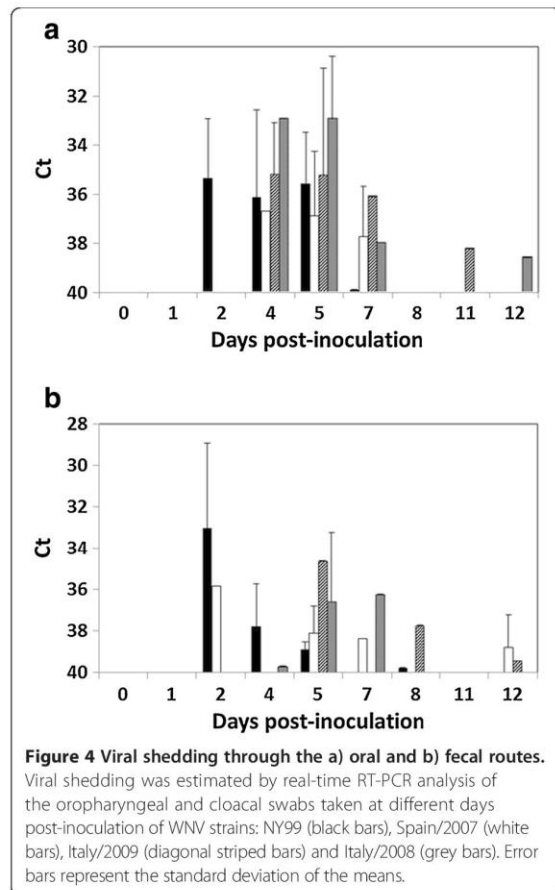


Table 3 Viral genome load in tissues from succumbing and surviving house sparrows

Organs	Real-time RT-PCR results	Succumbing HoSp			Surviving HoSp (21 dpi)			
		NY99	Spain/2007	Italy/2009	NY99	Spain/2007	Italy/2009	Italy/2008
Heart	Positives/total	2/2	2/2	1/1	4/6	0/6	3/7	0/8
	Ct (mean)	16.4	26.0	27.1	36.7	n.d.	37.8	n.d.
	Ct (range)	15.7-17.1	24.6-27.5	-	35.8-37.9	-	37.5-38.3	-
Liver	Positives/total	2/2	2/2	1/1	5/6	0/6	2/7	3/8
	Ct (mean)	14.2	24.5	29.6	34.5	n.d.	36.9	34.3
	Ct (range)	13.5-14.8	22.9-26.2	-	31.1-37.8	-	36.4-37.4	33.0-36.1
Brain	Positives/total	2/2	2/2	1/1	3/6	0/6	3/7	3/8
	Ct (mean)	18.0	31.9	27.9	32.3	n.d.	36.4	38.0
	Ct (range)	17.8-18.3	31.0-32.8	-	31.3-34.2	-	35.0-39.0	36.7-39.6
Kidney	Positives/total	2/2	2/2	1/1	5/6	4/6	4/7	6/8
	Ct (mean)	14.6	27.9	23.6	29.0	33.1	33.1	33.3
	Ct (range)	14.2-15.1	27.6-28.3	-	26.2-33.2	31.2-36.9	28.5-37.3	29.4-39.2
Spleen	Positives/total	2/2	2/2	1/1	2/2	4/6	5/7	6/8
	Ct (mean)	13.1	23.4	23.8	31.7	35.2	35.0	33.0
	Ct (range)	13.1-13.1	22.1-24.7	-	31.6-31.7	32.7-39.1	32.3-36.8	29.7-39.6

Viral RNA was estimated by real-time RT-PCR in tissues from five different organs of either succumbing or surviving HoSp, sacrificed 21 dpi with WNV as described in the text. Real-time RT-PCR results are expressed as positive (Ct < 40.0) over total samples analysed in each group, and as average viral genome load, expressed as mean Ct for each tissue. The Ct ranges (maximum and minimum values) obtained in each group are also indicated. (n.d.: not detectable).



few. One such study [16] revealed relatively high replication and mortality rates in HoSp caused by infection with the North American (NY99) and Kenyan (KN-3829) strains, while the Australian (Kunjin-6453) strain was found less pathogenic. In the present work, these results were extended to three new WNV strains (Spain/2007, Italy/2008 and Italy/2009) isolated in southern Europe, all of which belong to the Western-Mediterranean cluster within lineage 1a of WNV (see [17] for details of their phylogenetic assignment). The methodology used closely resembles that of the study by Langevin et al. [16] with the exception of the differing origins of the HoSp (Spain vs. US), a fact that could have a certain relevance due to possible differences in the genetic background of the birds studied. Despite this, our results confirm that HoSp is susceptible to WNV infection: while most individuals remain asymptomatic, a variable percentage suffers from more severe clinical disease that can be lethal in some instances. Thus, HoSp of European origin do not behave differently in this regard from North American HoSp. In

addition, our results support the main conclusion of the study by Langevin et al. [16], that is, Old-World WNV strains can be as pathogenic for HoSp as North American ones. However, aside from the degree of virulence, we observed certain differences between NY99 and the three Euro-Mediterranean WNV strains in the course of the infection.

Overall, compared to the Euro-Mediterranean strains, NY99 produced greater viremia, earlier mortality, higher morbidity, higher viral load in organs of birds either succumbing or surviving to the infection, and earlier and more consistent virus shedding either through oropharyngeal or cloacal routes. The host-competence index calculated for NY99 was also higher than for any of the three Euro-Mediterranean strains examined, supporting the hypothesis that mosquito vectors may acquire the infection more readily when feeding from NY99-infected HoSp than from HoSp infected with the Euro-Mediterranean strains tested. It is remarkable that there are so few amino-acid changes throughout the complete polyprotein sequences (3433 amino acids) of the three Euro-Mediterranean strains examined in this work: 16 amino-acid positions differ between Spain/2007 and both Italian isolates, Italy/2008 and Italy/2009, while these latter two differ mutually in only four positions. One of these changes affects the NS₃₂₄₉ position. It has been shown experimentally that, when this position is occupied by proline (Pro) instead of threonine (Thr), the virulence of WNV for American crows (*Corvus brachyrhynchos*) is enhanced [30]. This position is occupied by Pro in NY99, Spain/2007 and Italy/2008, and by Thr in Italy/2009 (Table 1). Therefore, the mere presence of Pro at NS₃₂₄₉ was not sufficient to determine the virulence observed for HoSp in this study. This result is not surprising given that strains NY99 (NS₃₂₄₉-Pro) and KN-3829 (NS₃₂₄₉-Thr) behaved similarly in terms of virulence for HoSp [16], a finding that agrees with our previous observations [20,22].

The results shown in this work indicate that at least some WNV strains circulating in southern Europe are pathogenic for an avian species as common as the HoSp. Therefore, a certain level of mortality in HoSp should also be expected in the Euro-Mediterranean region in areas affected by WNV outbreaks. Remarkably, no substantial wild bird mortalities have ever been observed in association with WNV circulation in this region, a circumstance that contrasts with the situation in North America, where wild bird mortalities (affecting HoSp among other species) are widespread [31]. Moreover, wild-bird mortality events in North America are considered as an early-warning signal for monitoring WNV circulation in the field. This type of alert based on wild-bird mortality is seldom of any – or no – use in Europe and the Mediterranean, which emphasizes that, despite dealing with the same pathogen,

surveillance systems must be adapted to the peculiarities of each transmission scenario.

The difference between North America and the Euro-Mediterranean region in observed wild bird mortality due to WNV still demands a satisfactory explanation. Possible reasons including either the greater virulence of North American WNV strains or a higher susceptibility of North American bird species have been proposed. However, the results obtained in this work do not match particularly well either of these hypotheses: on the one hand, HoSp from both continents are susceptible to lethal WNV infection but, on the other, some WNV strains in Europe are not so different from the North American type strain (NY99) in terms of mortality for HoSp. Therefore, other hypotheses must be formulated and experimentally tested to explain these facts. In this regard, NY99 exhibited a higher replication capacity in HoSp than the Euro-Mediterranean WNV strains analysed. Accordingly, NY99 also had greater viremia profiles, greater virus shedding, an earlier onset of clinical signs and greater morbidity in two clinically affected individuals – neither of which recovered within the monitoring period – that under natural conditions (i.e. in the field) would have been unlikely to survive. Although this higher replication capacity did not result in a significant increase in mortality, it did give rise to higher mean peak viremias, which in turn can influence the host competence index. This index was also found to be higher for NY99 than for the other WNV strains tested. This fact reveals an enhanced amplification capacity that would hypothetically lead to more transmission events in cases of HoSp infection with NY99-like strains, eventually giving rise to a more exacerbated cycle, a greater basic reproductive ratio (R_0), and consequently, more infections and thus more deaths. The higher viral loads observed in organs also suggest a higher potential for viremia recrudescence and long-lasting infections for NY99, thus transmission by predation would also be more likely.

The NY99, Spain/2007 and Italy/2009 strains were isolated from diseased birds in the context of WNV outbreaks (that is, accompanied by similar birds showing evidence of WNV infection that also succumbed to it), whereas the Italy/2008 strain was isolated from a magpie that was shot during a pest-control programme. Interestingly, Italy/2008 did not cause any mortality in the infected HoSp. This fact could be indicative of the potential circulation in Europe of low-pathogenicity WNV strains that could be more difficult to detect and isolate given that they are not associated with bird mortalities [32]. However, this result should not be over-interpreted since 1) the observed differences in mortality in HoSp inoculated with the different WNV strains derive from a small number of inoculated birds; 2) a given WNV strain can be highly virulent in a given host species but

be of low virulence in other(s), and 3) the fact that the magpie from which Italy/2008 was isolated was shot does not strictly mean that it was not affected by the disease. Further work is necessary to determine whether or not these strains are different in terms of their virulence for a wider range of hosts.

Conclusion

The house sparrow is a suitable model for studying West Nile virus infection. This study confirms that it is susceptible to WNV infection and disease, and is a competent host for the transmission of WNV strains from both North America and the Euro-Mediterranean region. Although the differences observed in wild bird mortality between the continents remain unexplained, variations in host competence among WNV strains circulating in each continent could play a role. Further studies are needed to clarify this finding and, in particular, more experimental infections using a wider range of WNV strains and host species from the two continents should be performed to allow for more thorough comparisons.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JA: prepared the inocula, carried out experimental infections, the clinical and analytical follow-ups, the analysis of clinical samples and the interpretation of the results, and contributed to the drafting of the manuscript; FL: prepared the inocula and carried out the experimental infections, the clinical and analytical follow-ups, the analysis of clinical samples and the interpretation of the results; JF: captured and cared for the house sparrows used in the experiment before inoculation, and collaborated in the study design, the statistical analyses and the interpretation of the results, and contributed to the drafting of the manuscript; RCS: captured and cared for the house sparrows used in the experiment before inoculation, collaborated in the design of the study and interpretation of the results, and contributed to the drafting of the manuscript; AM: isolated and prepared some of the viral stocks used in the inoculations, participated in the design of the study and in the interpretation of the results, and contributed to the drafting of the manuscript; PC: isolated and prepared some of the viral stocks used in the inoculations, participated in the design of the study and in the interpretation of the results, and contributed to the drafting of the manuscript; HW: performed and interpreted the results of the immunohistological analyses and contributed to the drafting of the manuscript; MAJC: designed and coordinated the study, participated in the experimental infections and interpretation of the results, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Elisa Pérez-Ramírez, for critically reviewing the manuscript, Michael Lockwood for language review, the personnel at the Doñana Biological Station involved in the capture and acclimatization of the house sparrows used in the experiments, and staff at the CISA-INIA BSL-3 animal facilities where the experiments were carried out. This study was funded by grants from INIA (FAU2008-00002-00-00) and European Commission (HEALTH.2010.2.3-3-3 261391 EuroWestNile project).

Author details

¹Centro de Investigación en Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), Ctra Algete-El Casar s/n, Valdeolmos, Spain. ²Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Avenida de Americo Vespucio s/n, Sevilla, Spain. ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Via Bianchi 7/9, Brescia, Italy. ⁴Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine in Vienna Veterinärplatz 1, Vienna A-1210, Austria.

Received: 4 November 2013 Accepted: 4 March 2014
Published: 19 March 2014

References

- Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E: **West Nile Virus: biology, transmission, and human infection.** *Clin Microbiol Rev* 2012, **25**:635–648.
- Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, Holmes EC: **Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*.** *Adv Virus Res* 2003, **59**:277–314.
- Kramer LD, Styer LM, Ebel GD: **A global perspective on the epidemiology of West Nile virus.** *Annu Rev Entomol* 2008, **53**:61–81.
- Brault AC: **Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility.** *Vet Res* 2009, **40**:43.
- Blitvich BJ: **Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus.** *Anim Heal Res Rev* 2008, **9**:71–86.
- Bowen RA, Nemeth NM: **Experimental infections with West Nile virus.** *Curr Opin Infect Dis* 2007, **20**:293–297.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M: **Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:311–322.
- Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N: **Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species.** *J Wildl Dis* 2006, **42**:1–13.
- Nemeth NM, Hahn DC, Gould DH, Bowen RA: **Experimental West Nile virus infection in Eastern Screech Owls (*Megascops asio*).** *Avian Dis* 2006, **50**:252–258.
- Weingartl HM, Neufeld JL, Copps J, Marszal P: **Experimental West Nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*).** *Vet Pathol* 2004, **41**:362–370.
- Brault AC, Langevin SA, Bowen RA, Panella NA, Biggerstaff BJ, Miller BR, Komar N: **Differential virulence of West Nile strains for American crows.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:2161–2168.
- Senne DA, Pedersen JC, Hutto DL, Taylor WD, Schmitt BJ, Panigrahy B: **Pathogenicity of West Nile virus in chickens.** *Avian Dis* 2000, **44**:642–649.
- Swayne DE, Beck JR, Zaki S: **Pathogenicity of West Nile virus for turkeys.** *Avian Dis* 2000, **44**:932–937.
- Nemeth NM, Oesterle PT, Bowen RA: **Passive immunity to West Nile virus provides limited protection in a common passerine species.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **79**:283–290.
- Nemeth N, Young G, Nduluka C, Bielefeldt-Ohmann H, Komar N, Bowen R: **Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*).** *Arch Virol* 2009, **154**:783–789.
- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA, Komar N: **Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*).** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:99–102.
- Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Vazquez A, Moreno A, Agüero M, Cordioli P, Tenorio A, Jimenez-Clavero MA: **Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus strains (1996–2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions?** *J Gen Virol* 2011, **92**:2512–2522.
- Beasley DW, Davis CT, Whiteman M, Granwehr B, Kinney RM, Barrett AD: **Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America.** *Arch Virol Suppl* 2004, **2004**:35–41.
- Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, Gromowski GD, Higgs S, Kinney RM, Barrett AD: **Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains.** *J Virol* 2005, **79**:8339–8347.
- Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Agüero M, Hoefle U, Blanco JM, Jimenez-Clavero MA: **Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean.** *Virology* 2009, **395**:289–297.
- Jimenez-Clavero MA, Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Llorente F, Blanco JM, Rodriguez-Ramos J, Perez-Ramirez E, Hofle U: **West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1489–1491.
- Sotelo E, Gutierrez-Guzman AV, Del Amo J, Llorente F, El-Harrak M, Perez-Ramirez E, Blanco JM, Hofle U, Jimenez-Clavero MA: **Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge.** *Vet Res* 2011, **42**:11.
- Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N: **Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**:652–656.
- Payne AF, Binduga-Gajewska I, Kauffman EB, Kramer LD: **Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay.** *J Virol Methods* 2006, **134**:183–189.
- Del Amo J, Sotelo E, Fernandez-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jimenez-Clavero MA: **A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus.** *J Virol Methods* 2013, **189**:321–327.
- Sotelo E, Llorente F, Rebollo B, Camunas A, Venteo A, Gallardo C, Lubisi A, Rodriguez MJ, Sanz AJ, Figuerola J, Jimenez-Clavero MA: **Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus.** *J Virol Methods* 2011, **174**:35–41.
- Komar N, Dohm DJ, Turell MJ, Spielman A: **Eastern equine encephalitis virus in birds: relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*).** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**:387–391.
- Turell MJ, O'Guinn M, Oliver J: **Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus.** *Am J Trop Med Hyg* 2000, **62**:413–414.
- Moulton MP, Cropper WP, Avery ML, Moulton LE: **The earliest house sparrow introductions to North America.** *Biol Invasions* 2010, **12**:2955–2958.
- Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, Panella NA, Holmes EC, Powers AM, Miller BR: **A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows.** *Nat Genet* 2007, **39**:1162–1166.
- Roehrig JT, Layton M, Smith P, Campbell GL, Nasci R, Lanciotti RS: **The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **267**:223–240.
- Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, Magallanes A, Tejedor CG, Tenorio A: **Putative new lineage of West Nile virus, Spain.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:549–552.

doi:10.1186/1297-9716-45-33

Cite this article as: Del Amo et al.: Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins. *Veterinary Research* 2014 **45**:33.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Capítulo IV

Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with two different West Nile virus strains: NY99 (lineage 1) and Austria/2008 (lineage 2).

Infección experimental del gorrión común (*Passer domesticus*) con dos cepas diferentes del virus West Nile: NY99 (linaje 1) y Austria/2008 (linaje 2)

Resumen

El virus West Nile (WNV) es un patógeno zoonótico que se mantiene en un ciclo enzoótico entre mosquitos y aves; los seres humanos, équidos, otros mamíferos y algunas especies de aves son hospedadores en fondo de saco. Las cepas del linaje 1 del WNV han sido predominantes en Europa desde la década de 1960. Sin embargo, en 2004 cepas pertenecientes al linaje 2 surgieron en Hungría y Rusia, respectivamente, extendiéndose desde entonces a varios países cercanos (p.e. Austria, Grecia, Italia, Serbia y Rumanía). La mortalidad de las aves silvestres es un hecho distintivo de los brotes en Norteamérica, un hecho poco común en Europa. El objetivo de este estudio es comparar el curso de la infección de cepas de WNV perteneciente al linaje 1 (NY99) y linaje 2 (Austria/2008) en el gorrión común, una especie de ave habitual en Europa y Norteamérica. Los gorriones fueron inoculados con las cepas NY99 o Austria/2008 de WNV. Un tercer grupo se usó como control de inoculación. En todos los grupos se evaluaron parámetros clínicos y analíticos (viremia, carga viral en tejidos y anticuerpos) hasta 14 días post inoculación. Aunque todos los gorriones fueron infectados, no se observó ni signos clínicos ni mortalidad debido a la infección. Sin embargo, la magnitud y duración de la viremia fue mayor en los gorriones inoculados con NY99 que con Austria/2008. El gorrión común ha demostrado ser un hospedador competente para ambas cepas, aunque el índice de competencia calculado para los gorriones inoculados con NY99 fue mayor que los inoculados con Austria/2008. La carga viral en órganos e hisopos fue también mayor para el grupo de gorriones inoculados con la cepa NY99. En conclusión, el gorrión común es un modelo de ave conveniente para el estudio de la competencia como hospedador para las cepas de WNV. Las diferencias observadas entre las cepas NY99 y Austria/2008 pueden tener importantes consecuencias epidemiológicas en la incidencia de la enfermedad y su capacidad de dispersión.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Short communication

Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus strains of lineages 1 and 2



Javier Del Amo^a, Francisco Llorente^a, Elisa Pérez-Ramírez^a,
Ramón C. Soriguer^b, Jordi Figuerola^b, Norbert Nowotny^{c,d},
Miguel Angel Jiménez-Clavero^{a,*}

^a Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)-INIA, Ctra. Algete-El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Spain

^b Estación Biológica de Doñana-CSIC, Seville, Spain

^c Institute of Virology, Viral Zoonoses, Emerging and Vector-Borne Infections Group, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

^d Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University, Muscat, Oman

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2014

Received in revised form 1 June 2014

Accepted 3 June 2014

Keywords:

West Nile virus
Experimental infection
House sparrow
Host competence
WNV lineage 1 and 2

ABSTRACT

West Nile virus (WNV) is a zoonotic pathogen which is maintained in an enzootic cycle between mosquitoes and birds; humans, equines, other mammals and some bird species are dead-end hosts. Lineage 1 WNV strains have predominated in Europe since the 1960s. However, in 2004 lineage 2 strains emerged in Hungary and Russia, respectively, spreading since then to a number of neighbouring countries (e.g., Austria, Greece, Italy, Serbia and Romania). Wild bird mortality is a hallmark of North American WNV outbreaks, a feature uncommon in Europe. This study aimed to compare the course of infection of lineage 1 (NY99) and lineage 2 (Austria/2008) WNV strains in the house sparrow, a bird species common in Europe and North America. House sparrows were inoculated with either NY99 or Austria/2008 WNV strains, or sham-inoculated, and clinical and analytic parameters (viraemia, viral load, antibodies) were examined until 14 days after inoculation. Although all inoculated sparrows became infected, no mortality or clinical signs were observed due to the infection. However, the magnitude and duration of viraemia were higher for NY99 – than for Austria/2008 – infected birds. The house sparrow proved to be a competent host for both strains, although the competence index calculated for NY99 was higher than for Austria/2008. Viral load in tissues and swabs was also higher in NY99-inoculated sparrows. In conclusion, the house sparrow is a convenient avian model for studying host competence of WNV strains. The observed differences between NY99 and Austria/2008 strains might have important epidemiological consequences for disease incidence and dispersal capacity.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

West Nile virus (WNV, family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) is a neurotropic arbovirus affecting man, horses and birds, that is maintained in an enzootic cycle between mainly *Culex* mosquito vectors and birds acting as primary

vertebrate hosts (Work et al., 1955). Two major genetic lineages, 1 and 2 (hereafter L1 and L2, respectively) are phylogenetically distinguishable. In North America, all circulating strains have been derived from a single introduction of L1, first detected in 1999 (type strain: NY99) (Lanciotti et al., 1999). North American outbreaks are characterized by wild bird mortality and high pathogenicity for humans and horses (Komar et al., 2003, 2001). In Europe, where WNV is known since the 1960s (Calistri et al., 2010), this virus was absent for nearly three decades and

* Corresponding author. Tel.: +34 91 6202300; fax: +34 91 6202247.
E-mail address: majimenez@inia.es (M.A. Jiménez-Clavero).

reemerged in the 1990s. Since then, several outbreaks of different magnitudes have occurred, mostly caused by strains belonging to L1 (Calistri et al., 2010). The first European L2 strains of WNV were reported in 2004 in Hungary (Bakonyi et al., 2006) and in Southern Russia (Platonov et al., 2008). Subsequently, L2 strains were detected in Austria (Bakonyi et al., 2013; Wodak et al., 2011), Greece (Papa et al., 2011), Italy (Savini et al., 2012), Serbia (Petrović et al., 2013), and Romania (Sirbu et al., 2011). The pathogenesis of L1 and L2 WNV strains has been compared experimentally only in gyrfalcons (Ziegler et al., 2013), and European jackdaws (Lim et al., 2014) but not in members of the *Passeridae* family, regarded as main amplifying hosts for WNV (Komar et al., 2003). One of such members, the house sparrow (*Passer domesticus*) is an ubiquitous bird species, abundant in urban and peri-urban areas, being a competent host for WNV L1 (Komar et al., 2003). To date, no experimental study has been attempted to assess the infection potential and host capacity of house sparrows by WNV L2 strains, but recently it has been reported that house sparrows have been infected naturally with lineage 2 WNV in Hungary in 2009 (Bakonyi et al., 2013). This passerine species has become a model for the study of WNV infection in susceptible avian hosts, which has been used to compare the course of infection of different WNV strains, including North American, Australian, African (Langevin et al., 2005) and European (Del Amo et al., 2014) isolates, all belonging to L1. The present study aims to compare the course of infection of house sparrows experimentally infected with two WNV strains belonging to two different lineages, L1 (NY99, American origin) and L2 (Austria/2008, European origin).

2. Materials and methods

2.1. Viruses and virus preparations

WNV strains used in this work were: NY99-crow-V76/1 (obtained through the National Veterinary Service Laboratories, USDA, lot no. 034EDV0601), a North American WNV strain, isolated from a diseased crow during the WNV outbreak in New York in 1999 (GenBank accession no. FJ151394; hereafter NY99) and Austria/2008_gh, isolated from the brain of a goshawk found dead in Vienna, Austria in 2008 (Bakonyi et al., 2013) (GenBank accession no. KF179640; hereafter Austria/2008). All the above virus strains were propagated and titrated by plaque assays in Vero cells (ATCC CCL-81).

2.2. Birds and animal care

Free-living house sparrows were captured using mist nets and banded in the province of Sevilla (Spain) in December, 2011. After a two months' period of habituation to captivity in the Cañada de los Pájaros facilities (Sevilla), they were transported to the BSL-3 biocontainment facility at CISA (Valdeolmos, Spain) where they were bled to determine pre-existing immunity to WNV and housed in individual cages. The house sparrows ($n=24$) were randomly distributed in three groups of eight individuals, composed (whenever possible) of 50% males and 50%

females. Mixed bird-seed and water were supplied *ad libitum*. All the animal care, handling and experimental procedures performed in this work were supervised and approved by the National Committee for Ethics and Welfare in Animal Experimentation in Spain according to European legislation (Council Directive 86/609/EEC).

2.3. Experimental inoculation

The inoculation was carried out essentially as described previously (Del Amo et al., 2014). Briefly, birds were inoculated subcutaneously in the neck with 0.1 ml of viral suspension containing approximately 10,000 plaque-forming units (pfu)/bird of NY99 WNV strain ($n=8$) or Austria/2008 WNV strain ($n=8$). The control group ($n=8$), was sham-inoculated with an equivalent volume of diluent (DMEM plus antibiotics) and manipulated in the same way as the virus-inoculated birds.

2.4. Clinical follow-up and collection of samples

The experimental procedure was based on Sotelo et al. (2011a), adapted to house sparrows as described (Del Amo et al., 2014), with some modifications, as follows: Clinical signs were monitored daily. Blood samples (0.1 ml obtained from the jugular vein) were collected at 1, 3, 5, 7 and 9 days post-infection (dpi) from all birds to determine viraemia and viral loads. Similarly, oropharyngeal and cloacal swabs were collected from all birds one day before inoculation, and at 1, 3, 5, 7 and 9 dpi. Blood samples were collected in sterile polypropylene tubes filled with 0.9 ml BA-1 diluent as previously described (Sotelo et al., 2011a), mixed and stored at -70°C until analysis. Swab samples were placed in sterile polypropylene tubes containing 1 ml PBS and immediately stored at -70°C until analysis. Two birds per group were euthanized at 7 and 10 dpi. The remaining birds were euthanized at the end of the experiment (14 dpi) except one, from the Austria/2008-inoculated group, which died at 7 dpi, likely as a consequence of manipulation during bleeding. Detailed necropsies were performed and tissue samples from brain, kidney, liver, heart and spleen were obtained from each individual and homogenized in PBS as described (Sotelo et al., 2011a). Additional blood samples (0.1–0.2 ml/individual) were collected prior to inoculation and just before euthanasia, in order to obtain serum for antibody detection.

2.5. Viraemia and viral load assays

Viraemia and viral load were measured as previously described (Del Amo et al., 2014). Briefly, viraemia was measured by a standard plaque-formation assay in Vero cells, and viral load in blood, tissue samples and oropharyngeal and cloacal swabs was measured using a semi-quantitative real-time RT-PCR method for the detection of L1 and L2 WNV genomes (Del Amo et al., 2013). Samples were considered positive in this test at $Ct < 40$.

2.6. Antibody detection assays

Antibodies to WNV were detected in serum by a commercially available epitope-blocking ELISA (Ingezym

West Nile Compac, INGENASA, Madrid, Spain) suitable for the detection of WNV antibodies in wild birds with low requirement of sample volume (Sotelo et al., 2011b). Neutralizing antibody titres were assessed by a standard virus-neutralization test (Sotelo et al., 2011b), using homologous virus as antigen.

2.7. Calculation of host competence index (Ci) values

The calculation of competence index values for the inoculated house sparrows was based on the formula described elsewhere (Komar et al., 1999), considering viraemia values above $10^{5.0}$ pfu/ml as infectious for *Culex pipiens* mosquitoes (Turell et al., 2000). The duration of infectious viraemia (d) was calculated by interpolation of the points crossing the value $y = 10^{5.0}$ pfu/ml in the viraemic curve.

3. Results

Neither mortality nor clinical signs were observed as a consequence of the infection of house sparrows with NY99 (L1) or Austria/2008 (L2) WNV. The mean peak viraemia was reached at 3 dpi in both inoculated groups, but house sparrows inoculated with NY99 strain developed higher virus titre and longer duration of the viraemic period than those inoculated with Austria/2008 ($9.62 \log_{10}$ vs. $6.72 \log_{10}$ and 8 vs. 6 days, respectively, Fig. 1). The magnitude and duration of viraemia indicated that the house sparrow is a competent host for transmission of both NY99 and Austria/2008 WNV strains. However, the competence index (Ci) calculated for NY99 strain was 2.09 whereas Ci was 0.60 for Austria/2008 strain (Table 1). All WNV-inoculated individuals seroconverted, as measured by ELISA, including those examined at 7 and 10 dpi. Neutralizing antibodies were detected in all NY99-inoculated individuals, with titres ranging from 1:20 to 1:80, and birds inoculated with L2 Austria/2008 strain, with titres between 1:10 and 1:40. The sham-inoculated (control) group, subjected to the same handling and sampling procedures as the inoculated groups, remained

Table 1

Host competence index for each group of house sparrows. Competence index is determined by susceptibility (s), infectiousness (proportion of vectors that could become infected per day) (i) and duration of transmissible viraemia (d). The equation to calculate competence index is $Ci = s \times i \times d$. Host competence index (Ci) is a value that reflects the relative number of infectious mosquitoes that would be derived from feeding these hosts.

Strain	Susceptibility (s)	Infectiousness (i)	Duration (d)	Ci
NY99	1.00	0.48	4.36	2.09
Austria/2008	1.00	0.19	3.16	0.60

asymptomatic, seronegative and aviraemic during the whole experiment.

In order to assess systemic infection and the extent of virus distribution in organs at different time points, two individuals from each group were euthanized at 7 and 10 dpi and the rest at 14 dpi. At 7 dpi, one of the Austria/2008-inoculated birds (no. 22) died during manipulation and was also subjected to necropsy. This particular bird developed lower viraemia and the lowest viral loads in tissues, as shown in Table 2, suggesting altogether that it died as a consequence of the manipulation and not due to the infection. Viral load was determined in heart, liver, brain, kidney and spleen samples (Table 2). Overall, WNV infection was widely disseminated throughout the body, but birds inoculated with the NY99 strain reached higher viral loads (lower Ct) than those inoculated with the Austria/2008 strain, in all organs analyzed. Also, WNV RNA was more consistently detected in organ samples from individuals inoculated with NY99 (38 positives out of 40 tissue samples analyzed) than in those with Austria/2008 (22 positives out of 40 analyzed). In general, viral genome load in tissues declined over time, being higher at 7 dpi and then fading progressively at 10 and 14 dpi. However, a significant variation between individuals was observed in this regard. For instance, in the group inoculated with Austria/2008, at 14 dpi, one individual (no. 20) still showed remarkable viral loads in all tissues, while others had almost (no. 19) or completely (no. 24) cleared the virus from the tissues examined. In kidney, the viral genome load remained slightly higher at the end of the experiment

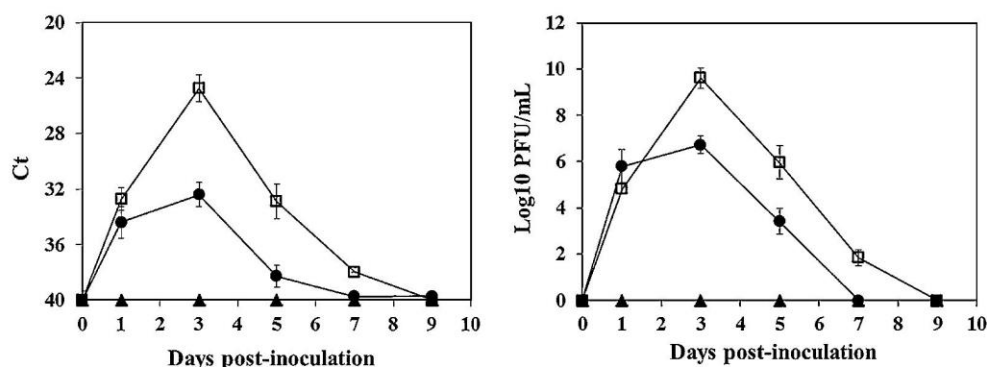


Fig. 1. Mean daily blood viral genome (left panel) and viraemia titres (right panel), plotted for two groups of eight house sparrow either inoculated with WNV strain NY99 (open squares) or WNV strain Austria/2008 (closed circles). Error bars represent the standard error of the data. The efficiency of the semi-quantitative real-time RT-PCR for viral genome load determinations was $E = 0.908$.

Table 2

Viral genome load in house sparrow tissues at different days post inoculation. Each tissue was analyzed by semi-quantitative real time RT-PCR and the viral load is shown as the Ct value. Except bird no. 22 that died during manipulation (bleeding), all others were subjected to programmed necropsies.

Days post-infection	Strain	No. of bird	Heart	Liver	Brain	Kidney	Spleen
7	NY99	1	26.3	18.5	23.0	23.9	21.9
		5	29.9	29.5	36.0	29.5	28.5
7	Austria/2008	17	33.2	33.6	36.3	35.7	29.3
		21	29.0	36.5	37.2	30.8	27.9
		22*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36.3
10	NY99	2	34.6	39.1	32.7	27.1	38.0
		6	33.1	34.0	24.9	25.9	27.6
10	Austria/2008	18	n.d.	38.1	n.d.	38.2	n.d.
		23	n.d.	n.d.	n.d.	37.7	n.d.
14	NY99	3	37.0	32.3	34.5	27.8	33.3
		4	38.3	37.8	36.7	n.d.	36.3
		7	38.7	33.4	31.6	28.6	30.0
		8	n.d.	38.2	28.9	30.0	30.7
14	Austria/2008	19	n.d.	n.d.	39.7	34.9	37.4
		20	39.6	38.4	28.9	28.1	29.4
		24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Dead during bleeding at 7 days post infection.

(14 dpi) than in the other organs, both in Austria/2008 and in NY99-inoculated birds, though, again, individual variations were observed (Table 2).

Assessment of viral genome shedding through the faecal and oral routes, yielded results consistent with those observed in blood and tissues: viral genome loads were higher, more persistent and more consistently detected in oropharyngeal and cloacal swabs from the group inoculated with the NY99 strain than from the group inoculated with the Austria/2008 strain (Fig. 2). Viral genome shedding in oral and cloacal swabs was detectable at 3 dpi in both groups. However, NY99-inoculated birds were still shedding virus genome through both routes at 9 dpi, while virus genome shedding ceased at 5 dpi in the Austria/2008-inoculated birds (with the exception of one bird found positive orally at 7 dpi).

4. Discussion

The house sparrow is an abundant *Passeridae* species often sharing habitat with humans in urban and peri-urban locations. This species is distributed world-wide although its native range is restricted to the Palearctic. The house sparrow is susceptible to WNV infection and disease, and a competent host for virus transmission to blood-sucking mosquitoes (Komar et al., 2003; Nemeth et al., 2009, 2008). Some important phenotypic traits of the virus, such as virulence, intensity of virus amplification and/or competence for virus transmission in this host can vary between different WNV strains (Del Amo et al., 2014; Langevin et al., 2005). In this context, it is worth mentioning that up to now, approximately two-thirds of the experimental studies made on WNV infection in wild birds used the North American L1 type strain (NY99) (Pérez-Ramírez et al., 2014), and only few studies have focused on more recent Euro-Mediterranean WNV strains. To date, only two experimental studies have specifically addressed the course of infection of European L2 strains in wild birds, one using gyrfalcons (Ziegler et al., 2013) and another one

using jackdaws (Lim et al., 2014). Hence, the present paper is the first one reporting the outcomes of an experimental infection of house sparrows with a L2 WNV strain, and comparing the effects of infection by L1 and L2 virus strains in a passerine species.

In the experimental design of the study it was considered important to include a reference strain to enable a comparison with other preceding studies. Strain NY99 was selected because it is the most commonly used strain in experimental studies in wild birds, including house sparrows. In these previous investigations, NY99 was found to be lethal for house sparrows in a range from 0% to 50% (0 to 38% in case of needle-inoculation) (Komar et al., 2003; Langevin et al., 2005; Lapointe et al., 2009; Nemeth et al., 2009). In the present experiment NY99 did not cause any mortality, but in a recent study using identical experimental procedures, the same virus batch and house sparrows captured at the same location (Sevilla, Spain), 25% mortality was observed after infection with NY99 (Del Amo et al., 2014). Mortality rates in both experiments fall in the range already described but the differences observed deserve further discussion. First, they may just reflect random variation because these differences in mortality rate with respect to Del Amo et al. (2014) were not statistically significant (*F*-Fisher exact test, $p=0.15$), possibly due to the small sample size. Second, the birds used in our experiment were captured 5 months later than in (Del Amo et al., 2014), which might have caused a bias in the age of the birds employed. Birds' age is known to be an important factor associated to host susceptibility (Pérez-Ramírez et al., 2014). Examination of plumage characteristics additionally indicated that in the previous experiment the proportion of young birds was higher than in the present experiment. The relevance of age as a determinant factor in the susceptibility of the house sparrow to WNV disease has been proven in the study by Nemeth et al. (2009), where differences in mortality were observed between adults (10%) and juveniles (23%) after inoculation with NY99 strain.

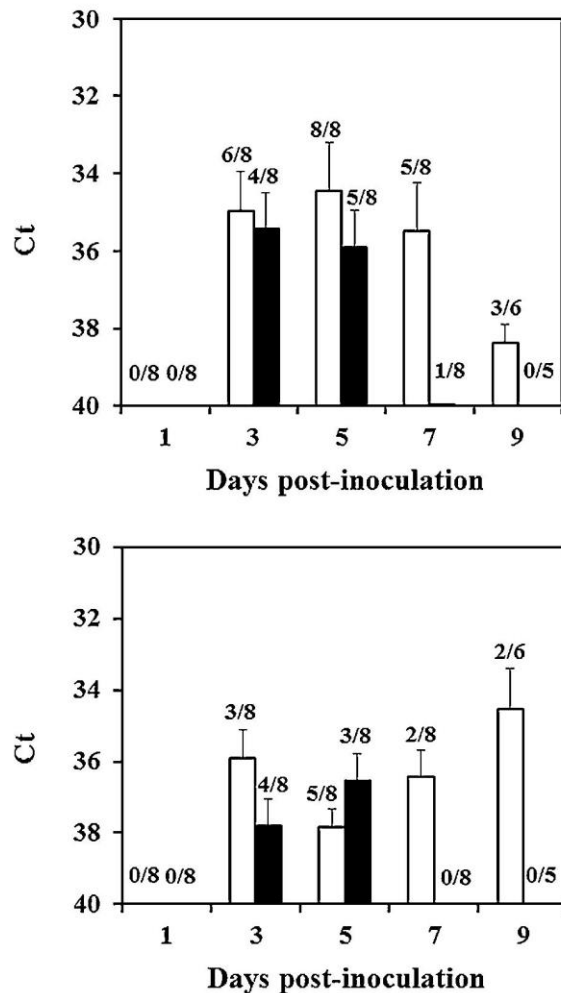


Fig. 2. Viral genome shedding through the oral (upper panel) and faecal (lower panel) routes as estimated by real-time RT-PCR analysis (expressed in Ct values) of the oropharyngeal and cloacal swabs, respectively, taken at different days post-inoculation of: WNV NY99 strain (white bars) and WNV strain Austria/2008 (black bars). Error bars represent standard error of the data. Over each bar, no. of positive/examined swab samples are indicated.

Similarly to the NY99 L1 strain, the L2 strain Austria/2008 resulted in an asymptomatic infection in the house sparrow. Despite this, the experiment highlights several interesting differences between both strains: NY99 produced an enhanced virus amplification which yielded higher and longer viraemias, generated higher and more persistent viral loads in organs, and more intense, consistent and persistent virus genome shedding through the oral and cloacal routes, compared to the strain Austria/2008. Accordingly, the host competence index calculated for NY99 was also higher than for Austria/2008, which suggests that mosquito vectors feeding on NY99-infected house sparrows may acquire the infection more readily than if feeding on Austria/2008-infected ones. In other words, house sparrows infected with NY99 would transmit the virus much more efficiently and for longer periods than those infected with the Austria/2008

strain, not only through mosquito bites, but possibly also when preyed or scavenged by other animals, like raptors (Nemeth et al., 2009), since the virus lasted for longer periods also in their organs. Despite seroconversion was observed in all house sparrows inoculated with either of the strains tested, a slightly lower (1:10–1:40 titre) neutralizing antibody response was detected in house sparrows of the group inoculated with the L2 strain Austria/2008 with respect to the neutralizing antibody response observed in those inoculated with L1 (NY99), which showed titres ranging from 1:20 to 1:80. This slight difference in immunogenicity could be consistent with a less intense infection by WNV Austria/2008, compared with WNV NY99, as the other results from this paper already indicate.

In this study, the L1 strain NY99 exceeded the amplification capacity of the L2 strain Austria/2008 in the house sparrow. This lower amplification capacity has also been observed for other L1 strains recently isolated in Southern Europe (Del Amo et al., 2014). Overall, it appears that “NY99-like” WNV strains would be transmitted more efficiently in a mosquito–bird cycle than the strains circulating in Europe in recent years. This may provide a suitable explanation for the epidemic spread and extensive wild bird mortality observed in North America, in comparison to Europe. Even though North American WNV isolates do not appear to be intrinsically more virulent than the European strains, at least for the house sparrow, they are likely more transmissible, leading to a more exacerbated cycle, a greater basic reproductive ratio (R_0) and more infection events. Although an increased transmissibility does not necessarily mean a higher mortality, for WNV strains similar to NY99, which cause certain levels of mortality in house sparrows and other birds, it is likely, as the number of infections grows, that the observed number of birds dying as a consequence of WNV disease would also increase.

In this study, the house sparrow has been confirmed to be a suitable model for estimating key parameters of WNV infection in the avian host, and how they differ between different virus strains. It would be interesting to apply this model to the study of newly emerging WNV variants, such as those involved in the recent outbreaks of human West Nile neuroinvasive disease in Europe.

Conflict of interest statement

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Acknowledgements

We would like to thank the personnel at the Doñana Biological Station and Cañada de los Pájaros, involved in the capture and acclimatization of the house sparrows used in the experiments, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, for permissions to capture the house sparrows, and staff at the CISA-INIA BSL-3 animal facilities, where the experiments were carried out. This study was funded by grants from INIA (FAU2008-00002-00-00),

European Commission (HEALTH.2010.2.3-3-3 261391 EuroWestNile project) and Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia RNM-7038).

References

- Bakonyi, T., Ferenczi, E., Erdélyi, K., Kutasi, O., Csörgő, T., Seidel, B., Weissenböck, H., Brugger, K., Bán, E., Nowotny, N., 2013. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe 2008/2009. *Vet. Microbiol.* 165, 61–70.
- Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., Nowotny, N., 2006. Lineage 1 and 2 strains of encephalic West Nile virus central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 618–623.
- Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G., Lelli, R., 2010. Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol. J.* 4, 29.
- Del Amo, J., Llorente, F., Figuerola, J., Soriguer, R., Moreno, A., Cordioli, P., Weissenböck, H., Jiménez-Clavero, M.A., 2014. Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins. *Vet. Res.* 45, 33.
- Del Amo, J., Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Llorente, F., Agüero, M., Jiménez-Clavero, M.A., 2013. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J. Virol. Methods* 189, 321–327.
- Komar, N., Dohm, D.J., Turell, M.J., Spielman, A., 1999. Eastern equine encephalitis virus in birds: relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 387–391.
- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., Bunning, M., 2003. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 311–322.
- Komar, N., Panella, N.A., Boyce, E., 2001. Exposure of domestic mammals to West Nile virus during an outbreak of human encephalitis, New York City, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 736–738.
- Lancioti, R.S., Roehrig, J.T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K.E., Crabtree, M.B., Scherret, J.H., Hall, R.A., MacKenzie, J.S., Cropp, C.B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H.M., Stone, W., McNamara, T., Gubler, D.J., 1999. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286, 2333–2337.
- Langevin, S.A., Brault, A.C., Panella, N.A., Bowen, R.A., Komar, N., 2005. Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 99–102.
- Lapointe, D.A., Hofmeister, E.K., Atkinson, C.T., Porter, R.E., Dusek, R.J., 2009. Experimental infection of Hawai'i 'Amakihi (*Hemignathus virens*) with West Nile virus and competence of a co-occurring vector, *Culex quinquefasciatus*: potential impacts on endemic Hawaiian avifauna. *J. Wildl. Dis.* 45, 257–271.
- Lim, S.M., Brault, A.C., van Amerongen, G., Sewbalaksing, V.D., Osterhaus, A.D., Martina, B.E., Koraka, P., 2014. Susceptibility of European jackdaws (*Corvus monedula*) to experimental infection with lineage 1 and 2 West Nile viruses. *J. Gen. Virol.* 95, 1320–1329.
- Nemeth, N., Young, G., Ndaluka, C., Bielefeldt-Ohmann, H., Komar, N., Bowen, R., 2009. Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Arch. Virol.* 154, 783–789.
- Nemeth, N.M., Oesterle, P.T., Bowen, R.A., 2008. Passive immunity to West Nile virus provides limited protection in a common passerine species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 283–290.
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., Nowotny, N., 2011. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2 Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 920–922.
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.A., 2014. Experimental infections of wild birds with West Nile virus. *Viruses* 6, 752–781.
- Petrović, T., Blazquez, A.B., Lupulović, D., Lazić, G., Escribano-Romero, E., Fabijan, D., Kapetanov, M., Lazić, S., Saiz, J., 2013. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro Surveill.* 18, 1–8.
- Platonov, A.E., Fedorova, M.V., Karan, L.S., Shopenskaya, T.A., Platonova, O.V., Zhuravlev, V.I., 2008. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol. Res.* 103 (Suppl.), S45–S53.
- Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., Di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., Pisciella, M., Terregino, C., Marangon, S., Capua, I., Lelli, R., 2012. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* 158, 267–273.
- Sirbu, A., Ceianu, C.S., Panculescu-Gatej, R.I., Vazquez, A., Tenorio, A., Rebreaun, R., Niedrig, M., Nicolescu, G., Pistol, A., 2011. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.* 16, 1–5.
- Sotelo, E., Gutierrez-Guzman, A.V., Del Amo, J., Llorente, F., El-Harrak, M., Perez-Ramirez, E., Blanco, J.M., Hofle, U., Jimenez-Clavero, M.A., 2011a. Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge. *Vet. Res.* 42, 11.
- Sotelo, E., Llorente, F., Rebollo, B., Camunas, A., Venteo, A., Gallardo, C., Lubisi, A., Rodriguez, M.J., Sanz, A.J., Figuerola, J., Jimenez-Clavero, M.A., 2011b. Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. *J. Virol. Methods* 174, 35–41.
- Turell, M.J., O'Guinn, M., Oliver, J., 2000. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 413–414.
- Wodak, E., Richter, S., Bagó, Z., Revilla-Fernández, S., Weissenböck, H., Nowotny, N., Winter, P., 2011. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet. Microbiol.* 149, 358–366.
- Work, T.H., Hurlbut, H.S., Taylor, R.M., 1955. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4, 872–888.
- Ziegler, U., Angenwoort, J., Fischer, D., Fast, C., Eiden, M., Rodriguez, A.V., Revilla-Fernández, S., Nowotny, S., de la Fuente, J.G., Lierz, M., Groschup, M.H., 2013. Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. *Vet. Microbiol.* 161, 263–273.

Conclusiones

Conclusiones

1. Para poder describir las especies de aves clave en la transmisión del WNV en un área determinada es necesario evaluar en conjunto las relaciones ecológicas entre las aves y los mosquitos y la competencia como hospedador de las aves para ese territorio.
2. La co-circulación en Europa de los linajes 1 y 2 del WNV y el virus Usutu hace necesario el desarrollo de técnicas diagnósticas que ayuden a diferenciar estos virus. La RT-PCR multiplex cuantitativa descrita en el capítulo II representa una novedosa herramienta para el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de los linajes 1 y 2 de WNV y del virus Usutu en los territorios donde están co-circulando.
3. El gorrión común es un modelo útil para el estudio de los principales parámetros que definen la infección por WNV en aves susceptibles, tanto para cepas de WNV de distinto origen geográfico como de distinto linaje.
4. La mayor competencia como hospedador del gorrión común para la cepa norteamericana NY99 con respecto a las cepas europeas estudiadas en esta Tesis, conlleva una mayor capacidad de difusión de la enfermedad, un mayor número de infecciones y, por ello, una mayor mortalidad absoluta. Por tanto, las diferencias en el índice de competencia de los hospedadores para las distintas cepas de WNV podrían ayudar a explicar algunas diferencias epidemiológicas observadas entre ambas regiones.

5. Para corroborar si existen diferencias en la mortalidad del gorrión común debido a la infección por las distintas cepas de WNV analizadas en esta Tesis, y así aumentar la potencia estadística de este parámetro, sería necesario incrementar el número de gorriones sujetos a infección en un mismo experimento.

